

(Photo)chemische Untersuchungen an 5-Deazaflavinen

**Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde
im Fachbereich Chemie
der Freien Universität Berlin**

**vorgelegt von
Hans-Jürgen Duchstein
aus Berlin**

Berlin 1977

(Photo)chemische Untersuchungen an 5-Deazaflavinen

**Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde
im Fachbereich Chemie
der Freien Universität Berlin**

**vorgelegt von
Hans-Jürgen Duchstein
aus Berlin**

Berlin 1977

1. Gutachter: Prof.Dr. H. FENNER
2. Gutachter: Prof.Dr. G. MANECKE

Tag der mündlichen Prüfung: 16.12. 1977

Meiner Familie
in Dankbarkeit
gewidmet

Die vorliegende Arbeit wurde am Pharmazeutischen Institut der Freien Universität Berlin unter Leitung von Prof. Dr. H. Fenner durchgeführt.

Für Anregungen in der Diskussion danke ich:

Helmut Fenner, Freie Universität Berlin,

Bernd Gärtner, Universität Konstanz,

Peter Hemmerich, Universität Konstanz,

Wolfgang Knappe, Universität Konstanz.

Bei Herrn Prof. Dr. P. Hemmerich möchte ich mich weiterhin für die zeitweise Überlassung eines Arbeitsplatzes an der Universität Konstanz bedanken.

INHALTSVERZEICHNIS

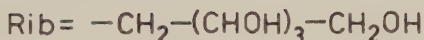
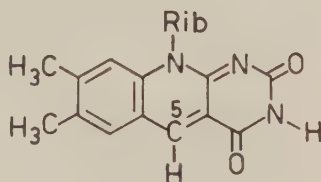
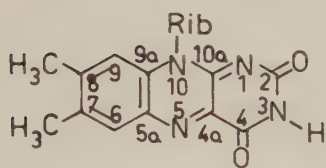
1.	EINLEITUNG UND PROBLEMSTELLUNG	9
2.	THEORETISCHER TEIL I (PHOTOCHEMISCHE UNTERSUCHUNGEN)	16
2.1.	Synthese der 5-Deazaflavine	16
2.1.1.	Modellsubstanzen: 7.8-Norverbindungen	19
2.1.2.	Dunkelreaktionen von 5-Deazaflavinen	19
2.1.3.	Allgemeine physikalische Daten von 5-Deazaflavinen	21
2.2.	Photochemische Reaktivität	26
2.2.1.	Einige exemplarische Ergebnisse der Flavinphotochemie	28
2.3.	Reaktionsbedingungen und Substrate für photochemische Reaktionen in der Deazaflavinreihe	29
2.3.1.	Wahl des Lösungsmittels	30
2.3.2.	Reaktionen in Wasser	30
2.3.2.1.	Die reaktive Spezies in Photoreduktionen: das Deazaflavintriplett	30
2.3.2.2.	Photoreaktionen mit Carbonsäuren	33
2.3.2.3.	Photoreaktionen mit Alkoholen im basischen Milieu	42
2.3.3.	Reaktionen in Acetonitril	44
2.3.3.1.	Ungesättigte Kohlenwasserstoffe	44
2.4.	Isolierung von einigen ausgewählten Endprodukten	50
2.4.1.	Dimerisierung	50
2.4.2.	Stereochemie des Dimeren	53
2.4.3.	NMR-Diskussion	56
2.4.4.	Isolierung und Eigenschaften der Dimeren	57
2.4.5.	Mechanismus der Dimerenbildung	61
2.4.6.	Massenspektroskopische Charakterisierung von Zwischenprodukten bei der deazaflavin- abhängigen Photoreduktion	64
2.4.7.	Isolierung und Eigenschaften von Deazaflavin- Substrat Addukten	65

2.4.7.1.	Reaktion von 5-Deazaflavin mit Phenoxyessigsäure	65
2.4.7.2.	NMR-Diskussion	66
2.4.7.3.	Eigenschaften des Phenoxyessigsäure-Adduktes .	67
2.4.7.4.	Reaktion von 5-Deazaflavin mit Cycloheptatrien	68
2.4.7.5.	NMR-Diskussion	68
2.4.7.6.	Weitere spektroskopische und chemische Eigenschaften des Cycloheptatrienyl-Adduktes .	70
2.5.	Mechanismus der deazaflavinabhängigen Photoreduktion	71
2.5.1.	Photokomproportionierungsreaktionen	72
2.5.2.	Isotopeneffekte bei Deazaflavin-abhängigen Photoreaktionen	78
2.5.2.1.	Synthese der deuterierten Verbindungen	79
2.5.2.2.	Photoreaktionen der deuterierten Spezies	80
2.6.	Weitere Photoreaktionen in der 5-Deazaflavin- bzw. der 5-Deazalumichromreihe	85
3.	THEORETISCHER TEIL II (DUNKELREAKTIONEN)	88
3.1.	Redoxreaktionen in der Deazaflavinreihe	89
3.1.1.	Darstellung von 5-Deazaflavin-Radikalen und deren Eigenschaften	91
3.1.2.	Reaktionen der unterschiedlichen Redoxstufen mit verschiedenen Oxidationsmitteln	93
3.2.	Reaktion von Deazaflavin mit nucleophilen Reagenzien	95
3.2.1.	Addition von Cyanid und Sulfit	97
3.2.2.	Addition von Carbanionen	104
4.	ZUSAMMENFASSUNG	111
5.	EXPERIMENTELLER TEIL	115
5.1.	Meßgeräte, Apparaturen	115
5.2.	Allgemeine Vorschrift zur präparativen Darstellung der Photoprodukte	119

5.2.1.	Reaktionen in wässriger Lösung	119
5.2.2.	Reaktionen in Acetonitril	119
5.3.	Synthese der Ausgangsverbindungen	120
5.4.	Photochemische Darstellung der Deazaflavin-Addukte	130
5.5.	Darstellung von Deazaflavin-Addukten durch Reaktion mit nucleophilen Reagenzien	134
5.6.	Synthese von 5-deuterierten Deazaflavinen	142
6.	LITERATURVERZEICHNIS	145

1. EINLEITUNG UND PROBLEMSTELLUNG

Im Zusammenhang mit Untersuchungen von O'BRIEN et al.¹⁾ über 2.4-Dioxo-pyrimido[4.5-b]chinoline wurde im Jahre 1970 eine interessante Modifikation eines wichtigen Redoxcoenzyms, des Riboflavins, gefunden.



Die Synthese des so erhaltenen 5-Deazariboflavins ermöglichte es, enzymologische Arbeiten mit diesem System durchzuführen (Literatur siehe Tabelle 1). Hierbei wurde die redoxaktive Komponente in verschiedenen Flavoproteinen -- FMN oder FAD -- durch die 5-Deazaanaloge ersetzt. Diese modifizierten Flavoproteine werden als 5-Deazaflavoproteine bezeichnet.

Da sich das 1.5-azachinoide Redoxsystem des Flavins durch die Variation der 5-Position entscheidend verändert, war zu erwarten, daß sich die Redox Eigenschaften der 5-Deazaflavoproteine entsprechend ändern sollten. Tabelle 1 zeigt die Flavoproteine, in die die 5-Deazaanaloge eingebaut worden sind und einige exemplarische Reaktionen.

Tabelle 1:

Enzymaktivitäten 5-deazaanaloger Flavoproteine ^{*)}

5-Deaza-flavoproteine	Reduktion durch Substrate	Reoxidation	Lit.
Benecka harveyi NAD(P)H: Oxidoreduktase	langsam ^{**)}	langsam, nicht enzymatisch	2)
N-Methyl-glutamatsynthetase	langsam	--	3)
D-Aminosäure-oxidase	langsam durch a) D-Alanin b) D-Methionin c) D-Prolin	keine	4) 5) 2)
"Old Yellow Enzyme" (NADPH : Sauerstoff- oxidoreduktase)	langsam	keine	2)
Aspergillus niger Glukose Oxidase	langsam	keine	2)
Mycobacterium smegmatis L-Lactat Monooxygenase	langsam	durch Produkt schnell + quantitativ, durch O ₂ keine	6)
Schweineleber Glykollat Oxidase	langsam	durch Produkt nicht quantitativ, durch O ₂ keine	7)
Xanthin Oxidase	keine Reaktion mit Xanthin, langsam m. NADH	keine	8)
Flavodoxin	keine Reduktion durch --- NADPH plus Ferredoxin- NADPH Reduktase		8,9)

^{*)} Die Tabelle ist an Tabelle 1 des Reviews von HEMMERICH et al. ⁸⁾ angelehnt. Ausführl. Daten sind der Primärliteratur und dem Review zu entnehmen.

^{**)} langsam, im Vergleich zu den schnellen Flavinreaktionen.

Die Interpretation dieser enzymologischen Arbeiten war bis zu Beginn der vorliegenden Arbeit unvollständig. Es zeigt sich aber, daß in den Deazaflavoproteinen von den flavinspezifischen Funktionen wie (De)Hydrierung, O_2 -Aktivierung und Elektronentransfer, nur noch die (De)hydrierung in sehr geringem Maße erhalten ist^{8,10)}.

Zur Erklärung dieser empirischen Fakten sollten wie in der Flavinchemie chemische Untersuchungen an Modellverbindungen geeignet sein, mit denen sich nur wenige Arbeitsgruppen beschäftigten. Einige von diesen Arbeiten werden nachstehend in chronologischer Reihe referiert.

BRÜSTLEIN und BRUCE¹¹⁾ beschäftigten sich mit einer Reaktion des 5-Deazaflavins, dem Hydrid-Transfer bei der Oxidation von reduziertem Nikotinamid mit Deazaflavin, um Aufschlüsse über den Mechanismus der entsprechenden flavinabhängigen Reaktion zu erhalten.

EDMONDSON et al.⁹⁾, die sich etwa gleichzeitig etwas ausführlicher mit den Reaktionen des 5-Deazaflavins beschäftigten, kommen auf Grund der großen strukturellen Verwandtschaft der beiden Spezies, spektraler Eigenschaften, und einiger Experimente, unter anderem der Photoreduktion von Deazaflavin mit EDTA, zu dem Ergebnis, daß sich Flavin und Deazaflavin in ihren Eigenschaften völlig analog verhalten.

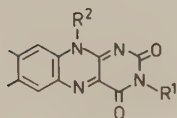
SONG und SUN¹²⁾ unterstützen die Behauptung der obigen Arbeitsgruppen, denn sie kommen auf Grund von MO-Berechnungen zu dem Schluß, daß die Reaktivität dieser Heterocyclen und dabei besonders die Reaktivität der 5-Position unabhängig vom Strukturelement $-N=$ oder $-CH=$ ist. Außerdem untersuchen sie in einer Nachfolge-Arbeit die Photoreduktion von Deazaflavin mit reduziertem Nikotinamid, welche nach ihren Ergebnissen zur vollständig reduzierten Stufe des Deazaflavins führt¹³⁾.

Auf Grund einiger Widersprüche in der Interpretation vieler Resultate durch die oben genannten Autoren und in Fortsetzung der Arbeiten über Deazaalloxazine^{14,15)} und

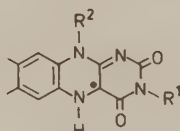
5-Thiaaalloxazine¹⁶⁾ beschäftigte sich unsere Arbeitsgruppe weiter mit den Modellverbindungen für modifizierte Flavine^{*)}.

Dabei wurden die 5-Thiaflavine, eine weitere Modifikation des Flavinsystems in der Dissertation GRAUERT^{18,19,20)} und in Zusammenarbeit mit den Arbeitsgruppen HEMMERICH²¹⁾ und MASSEY²²⁾ untersucht.

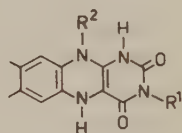
Es zeigt sich hierbei, daß ein dem Fl_{ox} entsprechendes sFl_{ox} bei diesen modifizierten Flavine instabil ist bzw. nur unter extrem sauren Bedingungen gebildet wird¹⁸⁾.



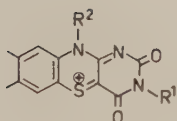
Fl_{ox}



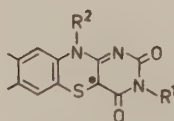
$\text{Fl}^{\bullet}$



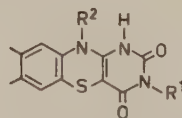
$\text{Fl}_{\text{redH}_2}$



sFl_{ox}^+



$\text{sFl}^{\bullet}$



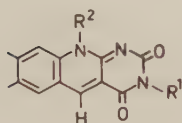
$\text{sFl}_{\text{redH}_2}$

Die Radikalstufe $\text{sFl}^{\bullet}$ sowie die vollständig reduzierte Stufe sFl_{redH} sind wesentlich stabiler als vergleichbare Flavin-spezies. Durch Datenvergleich dieser Thiaflavinredoxstufen mit denen der entsprechenden Flavine wird deutlich, daß beide Systeme nicht nur formal isoelektronisch, sondern isochrom sind¹⁸⁾.

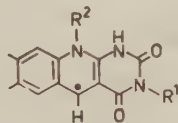
*) Parallel hierzu beschäftigte sich die Gruppe um CH.WALSH¹⁷⁾ mit den chemischen Eigenschaften der 5-Deazaflavine.

Daraus kann geschlossen werden, daß ein e^- -Transfer zwischen diesen beiden Redoxstufen sFl und $sFl_{red}H$, der in der Flavinderie bei Flavodoxin ausschließlich beobachtet wird, in diesen Modellverbindungen erhalten bleibt. Ein 5-Thiaflavoprotein müßte also diesen e^- -Transfer in biologischen Systemen ausführen können, da aber 5-Thiaflavine zu hohe Redoxpotentiale besitzen ist die Reversibilität, die bei Flavinen beobachtet wird, aufgehoben²²⁾.

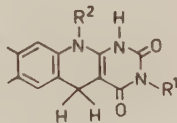
In den enzymologischen Arbeiten über 5-Deazaflavoproteine zeigt sich übereinstimmend, daß von den Aktivitäten des Flavins nur noch der Hydrid bzw. ein $2e^-$ -Transfer erhalten ist. Dieser Mechanismus sollte mit Hilfe von Studien an Modellverbindungen aufgeklärt werden, vor allem durch eine genaue Charakterisierung der unterschiedlichen Redoxstufen und deren Vergleich zum Flavinsystem*).



dFl_{ox}



dFl



dFl_{redH₂}

Das weitgehende Verständnis vieler flavinabhängiger Reaktionen beruht nicht allein auf den Ergebnissen von Untersuchungen der chemischen Reaktivität (Dunkelreaktionen), sondern wurde auch wesentlich durch photochemische Modelluntersuchungen ermöglicht³²⁻³⁶⁾. Für das Zustandekommen von enzymologischen Reaktionen des Flavinsystems mit biologischen Substraten ist das Vorhandensein eines intakten Flavoproteins obligatorisch - im Modell Lumiflavin fehlt die entsprechende Aktivierung. Werden jedoch die gleichen

*) Die Primärliteratur über Flavinchemie ist in folgendem Übersichtsartikel referiert: HEMMERICH, VEEGER und WOOD²³⁾, PENZER und RADDA²⁴⁾, LAMBOOY²⁵⁾, HEMMERICH, NAGELSCHNEIDER und VEEGER²⁶⁾, NEIMS und HELLERMANN²⁷⁾, RIVLIN²⁹⁾, HEMMERICH³⁰⁾ und BRUCE³¹⁾.

Substrate mit angeregtem Flavin - z.B. im Modell Lumi-flavin mit dem Triplett $^3\text{Fl}_{\text{ox}}^*$ - umgesetzt, findet man den Enzymreaktionen entsprechende Ergebnisse.

Die Bedeutung photochemischer Modelluntersuchungen für die Untersuchung von flavinabhängigen Reaktionen am Enzym wird durch das Beispiel der D-Aminosäure Oxidase Inhibierung durch MAO-Hemmer, z.B. Propagylamine^{37,38)} belegt. Erst nachdem ein auf photochemischem Wege erhaltenes Flavin-Substrat Addukt strukturell charakterisiert worden war^{36,39,40,41)}, gelang durch Vergleich die Aufklärung der entsprechenden Enzymreaktion^{42,43,44)}. Die Photoreaktionen von Flavinen mit Propagylaminen^{36,39,40,41)} und Dunkelreaktionen am Enzym^{42,43,44)} mit diesem Inhibitor führen zu einer identischen Struktur.

Photochemie kann demnach eine Methode sein, um an niedermolekularen Modellverbindungen ausgewählte Enzymreaktionen zu simulieren.

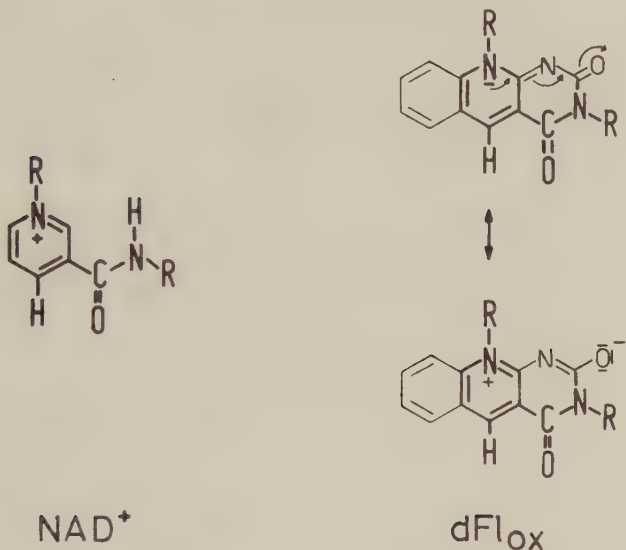
Auch in der Deazaflavinreihe sollte es möglich sein, über die Photochemie Hinweise auf die enzymologischen Reaktionen zu erhalten.

Folgende Aspekte sollten daher untersucht werden:

- a) Systematische Charakterisierung der einzelnen Redoxstufen und deren Eigenschaften.
- b) Untersuchung der photochemischen Reaktivität.
- c) Strukturelle und chemische Charakterisierung der Photoprodukte.
- d) Mechanismus der Photoreaktionen.

Die Beobachtung, daß bei 5-Deazaflavoproteinen nur noch (De)Hydrierungseigenschaften gefunden werden, deuten neben einer Flavinanalogie auch auf die Verwandtschaft zu einem anderen Coenzym hin, dem NAD^{8,10,45)}, welches ausschließlich zum Hydrid- bzw. $2e^-$ -Transfer in der Atmungskette befähigt ist.

Durch den Strukturvergleich wird dies deutlich:



Daraus ergibt sich eine Weiterführung der Problemstellung dieser Arbeit:

- e) An Hand von charakteristischen Reaktionen aus der NAD-Reihe, soll das chemische Verhalten von 5-Deazaflavinen und Nikotinamiden verglichen werden. Solche Reaktionen sind z.B. Carbanionen-Additionen^{46,47,48,49,50}, die ohne photochemische Aktivierung ablaufen sollten.

Damit läßt sich das Ziel der Arbeit in zwei Fragen zusammenfassen:

- 1) Ist das 5-Deazaflavin ein geeignetes Modell um den Mechanismus flavinkatalysierter Redoxreaktionen aufklären zu helfen?
- 2) Oder ist das 5-Deazaflavin ein System, welches eher dem NAD analog ist und nur strukturelle Ähnlichkeiten mit dem Flavin aufweist?

2. THEORETISCHER TEIL I (PHOTOCHEMISCHE UNTERSUCHUNGEN)

2.1. Synthese der 5-Deazaflavine

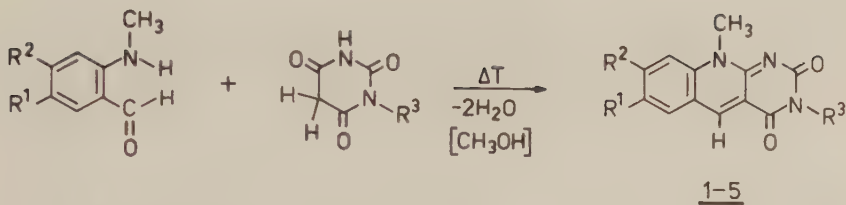
Als Deazaflavine bzw. Deazaaisoalloxazine werden, wie schon oben erwähnt, die Flavinmoleküle bezeichnet, in denen ein Stickstoffatom durch andere Atome oder Atomgruppen ausgetauscht worden ist.

Diese Arbeit beschäftigt sich nun im besonderen mit den 5-DEAZAFLAVINEN bzw. 5-DEAZAISOALLOXAZINEN und deren Reaktionen. Die Verbindungen sind seit 1948 bekannt, und sie sind nach mehreren Wegen zu synthetisieren^{1,21,51,52}). Die folgende Übersicht zeigt die neueren Synthesewege nach O'BRIEN et al.¹⁾ und nach HEMMERICH und JANDA²¹⁾ bzw. YONEDA et al.⁵²⁾. Eine dritte Variante ist die nach KING, KING und THOMPSON⁵¹⁾, durch die allerdings nur 5-substituierte 5-Deazaflavine darstellbar sind.

(Nach einer der O'BRIEN Synthese analogen Methode wurden bereits 1901 die 5-Deazaalloxazine von CONRAD und REINBACH⁵³⁾ beschrieben.)

Da die Synthesewege in anderen Arbeiten^{14,54)} schon eingehend beschrieben sind, sollen folgende Übersichten genügen, um zu zeigen, wie die wichtigsten Ausgangsverbindungen dargestellt worden sind.

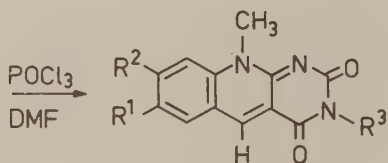
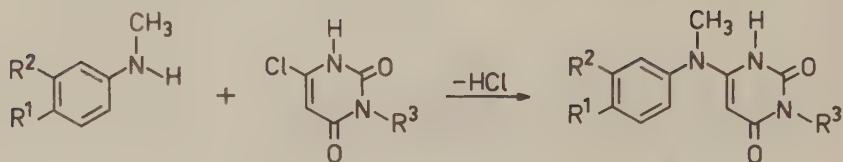
1. O'BRIEN et al.¹⁾



	R ¹	R ²	R ³
1	H	H	CH ₃
2	H	H	H
3	H	H	CH ₂ - 
* 4	CH ₃	CH ₃	H
* 5	CH ₃	CH ₃	CH ₃

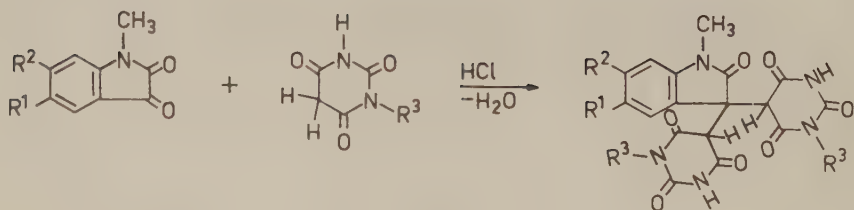
*) Die Verbindungen 4 und 5 sind von O'BRIEN¹⁾ nicht dargestellt worden, wurden aber im Verlaufe dieser Arbeit nach dieser Methode synthetisiert.

2. HEMMERICH²¹⁾ bzw. YONEDA⁵²⁾

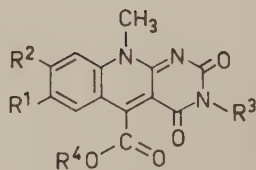


1-5

3. KING et al.⁵¹⁾



	R ¹	R ²	R ³	R ⁴
6	H	H	CH ₃	H
7	H	H	CH ₃	CH ₃

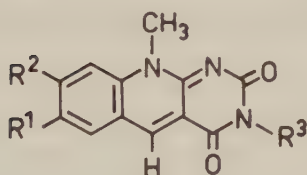


6,7

2.1.1. Modellsubstanzen: 7.8-Norverbindungen

In der Flavinreihe konnte für viele Reaktionen, insbesondere Photoreaktionen, gezeigt werden³⁰⁾, daß Isoalloxazine (7.8-Norbindungen) den Flavinen (7.8-Methylverbindungen) analog reagieren.

In der Deazaflavinreihe sollten diese Ähnlichkeiten in den Reaktionen ebenso auftreten. Aus diesem Grunde wird die unten aufgeführte leichter zugängliche 7.8-Norverbindung 1 als Modell für die Deazaflavinreihe verwendet. Außerdem ist die 3-Stellung durch verschiedene Gruppen substituiert, um einmal die Löslichkeit in aprotischen (R^3 = Methyl, Benzyl), zum anderen in protischen Lösungsmitteln (R^3 = $-(CH_2)_3-SO_3K$ ⁵⁵⁾) zu erhöhen.



	R ¹	R ²	R ³
1	H	H	CH ₃
3	H	H	CH ₂ - 
8	H	H	(CH ₂) ₃ -SO ₃ K

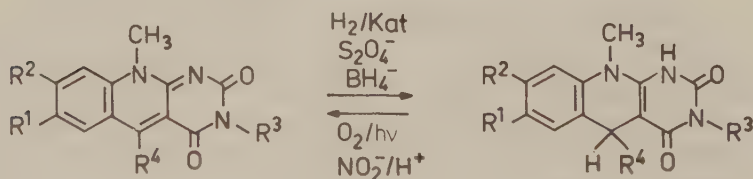
Zum Beweis, daß die oben stehende Verbindung 1 wirklich ein geeignetes Modell ist und die 7.8-Substitution durch Methylgruppen für die meisten Reaktionen nur eine untergeordnete Rolle spielt, wurde das "echte" 5-Deazaflavin im Anschluß an die Untersuchungen der 7.8-Norverbindung für einige ausgewählte charakteristische Reaktionen verwendet und dabei keine entscheidenden Unterschiede festgestellt (s. Seite 135).

2.1.2. Dunkelreduktionen von 5-Deazaflavinen

Wie schon in der Einleitung erwähnt, existiert das Deazaflavin ebenso wie das Flavin formal in drei verschiedenen

Redoxstufen. Die Reduktion im Dunkeln mit den verschiedenen wasserstoffübertragenden Reagenzien zum vollständig reduzierten 1.5-Dihydrodeazaflavin wurde schon in verschiedenen Arbeiten beschrieben und bedarf an dieser Stelle keiner weiteren ausführlichen Bearbeitung^{9,10,11,14,17}).

Zum Vergleich mit den folgenden Photoreduktionen seien sie noch einmal erwähnt. In allen Fällen wird die beim Flavin stabile Semichinonstufe nicht gebildet, sondern unter Aufnahme von zwei Redoxäquivalenten ein 1.5-Dihydroderivat erhalten. Die Radikalstufe ist thermodynamisch instabil und kann nur bei spezifischen Reaktionsbedingungen wie Pulsradiolyse⁵⁶), Blitzlichtphotolyse¹⁰) und elektrochemischer Reduktion¹⁰) gebildet werden (siehe Seite 91). Über die Reaktionen der Radikalstufe wird im Verlaufe der Arbeit noch gesprochen, da diese eine Zwischenstufe bei deazaflavinabhängigen Photoreduktionen darstellen kann. Im folgenden Schema sind die Dunkelreduktionen von Deazaflavinen zusammengefaßt.



dFl _{ox}	R ¹	R ²	R ³	R ⁴	dFl _{redH₂}
1	H	H	CH ₃	H	9
3	H	H	CH ₂ - 	H	10
5	CH ₃	CH ₃	CH ₃	H	11
6	H	H	CH ₃	COOH	12
7	H	H	CH ₃	CO ₂ CH ₃	13

Im Gegensatz zum Flavin ist die Dihydropstufc gegen Sauerstoff im Dunkeln relativ stabil und wandelt sich erst mit einer Halbwertszeit, die weit größer als 40h ist, in dFl_{ox} u. (Die Reaktion Fl_{red}H₂ → Fl_{ox} hat nur eine Halbwertszeit - abhängig von der Polarität des Lösungsmittels - in der Größenordnung von Sekunden.³³⁾ Erst durch stärkere Oxidationsmittel kann dFl_{ox} schnell zurückgebildet werden. Solche Oxidationsmittel sind Nitrit in Eisessig und O₂ mit Licht als Katalysator. Die unterschiedlichen Redoxstufen des 5-Deazaflavins werden im Kapitel 3. im Vergleich zum Flavin und NAD⁺ ausführlich besprochen. Auch auf die erwähnte vollständig reduzierte Stufe wird dabei noch einmal eingegangen.

2.1.3. Allgemeine physikalische Daten von 5-Deazaflavinen

Wie schon in anderen Arbeiten^{12,31)} gezeigt, ähneln Deazaflavine dem Flavin bezüglich der spektroskopischen Eigenschaften. Anhand der UV- und Fluoreszenzspektren lassen sich Übereinstimmungen im oxidierten Zustand feststellen und eine deutliche Flavinanalogie formulieren. (s. Tab. 2) Das UV-Spektrum von 1 zeigt eine langwellige Absorption bei 393 nm, bei Substitution der 7 und 8-Stellung durch Methylgruppen verschiebt sich dieses Maximum um ca. 10 nm bathochrom, ähnlich wie beim Übergang von Isoalloxazinen zu Flavinen. Das zeigt deutlich, daß besonders die Substitution der 8-Stellung einen Beitrag (durch Hyperkonjugation) zum chromophoren System liefert.

Folgende mesomere Grenzstrukturen von 5 sind zu formulieren.

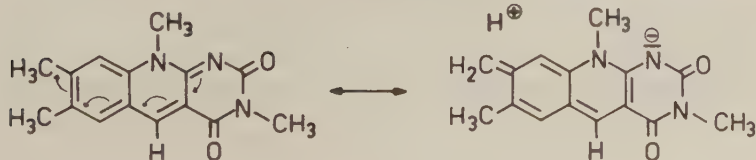


Tabelle 2:

Spektroskopischer Vergleich der oxidierten Sufo von 5-Deazaflavinen und Flavinen.

UV-Spektren $\lambda_{\max}$ in nm (ϵ)

dFl _{ox} <u>1</u>			dFl _{ox} (7.8 Me) <u>5</u>		
H ₂ O	CH ₃ CN	6N HCl	H ₂ O	CH ₃ CN	6N HCl
393(12000)	416(sh)	330(22900)	415(sh)	426(sh)	350(21900)
323(12000)	397(13500)	253(52700)	401(14300)	404(14000)	259(40200)
256(53900)	376(sh)		329(12200)	380(sh)	225(20300)
218(42900)	315(10800)		259(40700)	320(12500)	
	307(sh)		223(33900)	308(sh)	
	262(54700)			263(39900)	
	218(41500)			223(33000)	

Fl_{ox} (7.8 Me) 14a

H ₂ O	CH ₃ CN	6N HCl
449(12000)	468(sh)	390(20000)
374(10300)	445(12500)	264(35000)
268(31600)	425(sh)	222(28000)
223(28500)	340(9000)	

Fluoreszenzspektren $\lambda_{\max}$ in nm

dFl _{ox} <u>1</u>	Fl _{ox} (7.8 Me) <u>14a</u>
H ₂ O	H ₂ O
455	518

Der Austausch des Stickstoff-Atoms in 5-Stellung durch eine Methingruppe hat eine hypsochrome Verschiebung um 40-45 nm zur Folge (Übergang Flavin - Deazaflavin). Die Form der Spektren mit den 4 Maxima ähneln sich sonst sehr, so daß man von ähnlichen Verhältnissen wie im Flavin ausgehen kann. Die beiden längstwelligen Absorptionsmaxima werden beim Flavin unabhängigen $\pi - \pi^*$ Übergängen zugeordnet^{35,57)}, während die kurzwelligen Maxima aus mehreren elektronischen Übergängen gebildet werden. Wird die Polarität des Lösungsmittels herabgesetzt, bildet sich bei den beiden längstwelligen Maxima eine vibrationelle Feinstruktur aus, und die Bande bei 323 nm verschiebt sich hypsochrom, während die längstwellige Bande kaum eine Verschiebung aufweist.

Bei Protonierung des Deazaflavin-Moleküls wird die längstwellige Bande hypsochrom, die nächstfolgende bathochrom verschoben, so daß sich beide Banden überlagern und mit höherer Intensität bei 330 nm für die 7.8-Norverbindung 1 und 350 nm für 7.8-Dimethylverbindung 5 erscheinen. Ähnliche Verhältnisse werden auch bei Flavinen vorgefunden³⁵⁾. Diese Tatsachen könnten den Schluß zulassen, daß Deazaflavine den Flavinen völlig analoge Moleküle darstellen^{9,12,31)}. Für den oben besprochenen oxidierten Zustand ist diese Betrachtungsweise auch annähernd richtig, denn es wird weiter unten gezeigt, daß die Lichtreaktionen aus dem ersten angeregten Triplettzustand des oxidierten Moleküls dem Flavin auffallend ähnlich sind.

Allerdings ändern sich bei Reduktion des Deazaflavins diese Verhältnisse grundlegend, was schon der Unterschied des Chromophors im UV-Spektrum zeigt.

Flavin bildet im reduzierten Zustand ein Spektrum aus, welches aus zwei Schultern bei 410 nm und 340 nm und einem Maximum bei 295 nm besteht. Die Schultern werden bei DUDLEY et al.⁵⁸⁾ mit dem FRANCK-CONDON-Verbot des $\pi - \pi^*$ Übergangs zum ersten angeregten Zustand des Flavohydrochinons erklärt.

Tabelle 3:

Spektroskopischer Vergleich der reduzierten Stufe von 5-Deazaflavinen und Flavinen.

UV-Spektren $\lambda_{\max}$ in nm (E)

dFl _{red} H ₂ <u>2</u>			dFl _{red} H ₂ (7.8 Me) <u>11</u> *		
H ₂ O pH=5	CH ₃ CN	H ₂ O/pH=11	H ₂ O	MeOH	H ₂ O/pH=11
316(12000)	312(11500)	314(11500)	319(13500)	318(12500)	314(13000)
228(15000)	227(21400)	262(22000)	232(16000)	230(17000)	262(18600)
		246(23000)			244(17600)

Fl _{red} H ₂ (7.8 Me) <u>14b</u>			
H ₂ O/pH=2	CH ₃ CN	H ₂ O/pH=8,5	H ₂ O/pH<0
400(sh)	410(sh)	400(sh)	316(9300)
290(8000)	340(sh)	345(sh)	250(32000)
250(25000)	295(8100)	288(7300)	
		256(30000)	

Fluoreszenzspektren $\lambda_{\max}$ in nm

dFl _{red} H ₂ <u>2</u>	Fl _{red} H ₂ (7.8 Me) <u>14b</u>
H ₂ O	keine Fluoreszenz
373	

*) nicht ausreichend löslich in CH₃CN

Dabei wird dem Grundzustand eine um die 5.10-Achse gewinkelte Struktur zugeschrieben, während der erste elektronische Anregungszustand planar ist. Bei Protonierung des nichtbindenden Elektronenpaares am N(5) entfällt dabei diese Endabsorption, die cyclische Resonanz wird endgültig aufgehoben. Dem Maximum bei 295 nm muß ein erlaubter $\pi - \pi^*$ Übergang zugeordnet werden.

Im Deazaflavin entfällt ähnlich wie beim protonierten Flavohydrochinon diese Endabsorption, da durch das Fehlen des

freien Elektronenpaares, wie am N(5) beim Flavin, die cyclische Resonanz nicht mehr existiert. Es tritt vielmehr nur ein erlaubter $\pi - \pi^*$ Übergang auf, der dem Maximum bei 316nm zuzuschreiben ist. Ähnliche Unterschiede weisen neben den Elektronenspektren auch die Fluoreszenzspektren für die beiden reduzierten Spezies auf. Während Dihydroflavine nicht fluoreszieren, kann bei Dihydrodeazaflavinen ein deutliches Emissionsmaximum bei 373 nm gemessen werden. Hier ergibt sich eine Analogie zum NAD^+ , dessen reduzierte Spezies ebenfalls fluoresziert.

Damit ist auf Grund dieser einfachen spektroskopischen Befunde eine Analogie im reduzierten Zustand in Frage gestellt. Untermauert wird diese Arbeitshypothese durch den Vergleich anderer physikalisch-chemischer Daten, nämlich den Redoxpotentialen.

Tabelle 4:

Redoxpotentiale von 5-Deazaflavinen, Flavinen und Nikotinamiden

Redoxpotentiale/pH=7	Deazaflavine ^{a)}	Flavine ^{b)}	Nikotinamide ^{c)}
1e ⁻ ox/red	-770 mV 59)	-240 mV 61)	-850 mV 62)
rad/red	+130 mV 59)	-172 mV 61)	+210 mV 62)
2e ⁻ ox/red	-320 mV 59)	-205 mV 61)	-320 mV 62)
	-275 mV 60)		

a) 5-Deazariboflavin 4a

b) Riboflavin 14

c) NAD^+ 15

ox = oxidierte Stufe

rad = Radikalstufe

red = reduzierte Stufe

Hier ergeben sich deutliche Diskrepanzen beim Vergleich von Deazaflavinen und Flavinen. Sowohl in den 1- wie 2 Elektronenpotentialen zeigt sich eher die Ähnlichkeit mit den Potentialen der Nikotinamidreihe. Weitere chemische Eigenschaften aller drei Redoxstufen werden im Verlauf dieser Arbeit auf die Analogie zwischen 5-Deazaflavinen und Nikotinamiden^{8,10)} hinweisen. Dieser Tatbestand wird in anderem Zusammenhang auch schon in der Dissertation von BAUCH⁵⁴⁾ erwähnt.

2.2. Photochemische Reaktivität

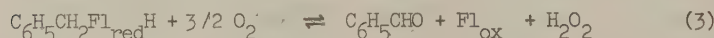
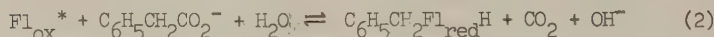
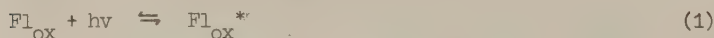
Da die Untersuchungen in der Deazaflavinreihe zunächst im Hinblick auf den Vergleich zur Flavinreihe durchgeführt werden, erschien es sinnvoll, nach Einbau des 5-Deazariboflavins in einige Enzyme und Untersuchungen der Reaktivität (siehe oben), auch die photochemische Reaktivität des Deazaflavingerüsts näher zu betrachten. Dabei werden im Flavinfall folgende grundlegende Unterscheidungen bezüglich der Vielfalt der Photoreaktionsmöglichkeiten getroffen.

1. "Photoelektronentransfer" z.B. mit Phenol⁶³⁾
2. Photolyse⁶⁴⁾ von Riboflavin zu Lumiflavin (intramolekulare Photodehydrierung im ersten Reaktionsschritt⁶⁵⁾ und Lumichrom (Photodealkylierung⁶⁶⁾).
3. Photoaddition von Wasser und Alkoholen⁶⁷⁾
4. Photoalkylierung mit wasserstoffübertragenden Substraten, wobei die Substrate photodehydriert (z.B. Cyclohexadien⁶⁸⁾) oder photodecarboxyliert (z.B. bei Carbonsäuren^{32,69,70,71,72)} werden.

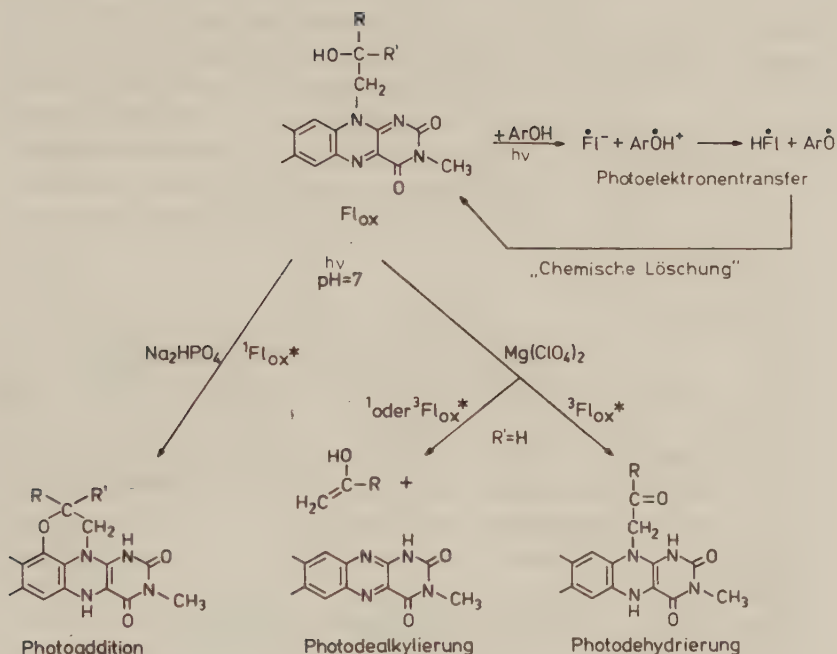
Schema 1 zeigt die wichtigsten Reaktionsmöglichkeiten.

Über alle diese Teilfragen wurde beim Flavin schon ausführlich berichtet, und es wurden Zusammenhänge zwischen Enzymologie und Photochemie³⁰⁾ erkannt und kritisch überprüft. (siehe Einleitung) Am Deazaflavinsystem interessierte nun besonders, ob dieses ebenso wie Flavin Substrate zu dehydrieren im Stande ist, und inwieweit man ähnlich wie beim Flavin von einer katalytischen Wirkung sprechen kann. Beim Flavin gilt nämlich folgendes Reaktionsschema:

z.B. für die Oxidation des Phenylacetats:



Schemä 1:



Unter anaeroben Bedingungen bildet sich aus Flavintriplett und Phenylacetatanion unter Wasserübertragung auf den Flavinteil ein benzyliertes Dihydroflavin, welches unter geeigneten Bedingungen durch Sauerstoff wieder zum Ausgangsflavin reoxidiert werden kann; wobei der Sauerstoff zu H_2O_2 reduziert wird. $1/2$ Mol Sauerstoff wird weiterhin dazu verwendet, um den Substratrest, in diesem Fall die Benzylgruppe, zu Benzaldehyd zu oxidieren.

Wenn man sich die Bruttogleichung ansieht, wird deutlich, daß das Flavin nicht mehr in diese eingeht, also die Funktion eines Katalysators übernommen hat. Da aber das Flavin

auf seiner alkyliert reduzierten Stufe gefaßt werden kann, und nicht nur als Energieträger fungiert, bezeichnet HAAS³⁵⁾ in seiner Dissertation solche Reaktionen als sekundäre Photosensibilisierung. Diese sind nach der oben gemachten Einteilung in die Photoalkylierungen (auf Grund der Teilgleichung 2) miteinzureihen. Solche Photoreduktionen sollen nun auf das 5-Deazaflavinsystem übertragen werden, da zwischen Flavinphotoreaktionen und der biologischen flavinabhängigen Substratdehydrierung ein enger Zusammenhang besteht.

2.2.1. Einige exemplarische Ergebnisse der Flavin-Photochemie

Flavine werden durch eine Vielzahl von Substraten photoreduziert. Einige Arbeiten aus dem Arbeitskreis von P. HEMMERICH³³⁻³⁶⁾ sind dabei besonders zu erwähnen.

Tabelle 5:

Substrate bei flavinabhängigen Photoreduktionen

Substanzklasse	Produkt	Lit.
ungesättigte Kohlenwasserstoffe	4a-Addukt $\rightarrow$ Fl _{red} H ₂	
Heterocyklen	4a-Addukt $\rightarrow$ Fl _{red} H ₂	
Mercaptane	[4a-Addukt] $\rightarrow$ Fl _{red} H ₂	32,33)
Thioäther	5-Addukt $\rightarrow$ [Fl _{red} H ₂]	
Alkohole	Fl _{red} H ₂	
Aldehyde	5-Addukt	
Amine	Fl _{red} H ₂	33,73)
Hydrazine, Hydrazone	4a-Addukt, 5-Addukt	74)
Propagylverbindungen	4a-Addukt, 5-Addukt	36,41)
Carbonsäuren	4a-Addukt $\rightarrow$ Fl _{red} H ₂	32-35)
	5-Addukt, 4a, 5-Addukt	63-73)
	8-Addukt	75-83)

Ohne den Anspruch auf Vollständigkeit zu erheben, soll eine kurze Übersicht gegeben werden, mit welchen Substraten Flavin bereits photochemisch umgesetzt worden ist. Diese Übersicht wird dann den Vergleich zu den folgenden Deazaflavinresultaten erleichtern. (s. Tab. 5)

Es zeigt sich, daß eine große Anzahl von Substanzklassen als Wasserstoff-Donator fungieren kann und sich dabei die unterschiedlichsten Resultate ergeben.

2.3. Reaktionsbedingungen und Substrate für photochemische Reaktionen in der Deazaflavinreihe

In der Tabelle 5 ist die Vielfalt der Substrate, die in der Flavinphotochemie bei Reduktionen Verwendung fanden, deutlich abzulesen. Aus dieser großen Auswahl werden nun einige Prototypen z.B. Carbonsäuren, Alkohole und ungesättigte Kohlenwasserstoffe für deazaflavinabhängige Photoreaktionen verwendet. Dabei ist es zunächst sinnvoll in Reaktionen im analytischen Maßstab (Konzentration von $dFl_{ox} = 10^{-4}$ Mol/l) die genauen Reaktionsbedingungen einer solchen Reaktion zu untersuchen. Diese Untersuchungen werden mit Hilfe der UV/VIS-Spektroskopie möglich, da Reduktionen zu signifikanten Veränderungen am chromophoren System führen.

Aus solchen "UV-Kinetiken" sind dann die entscheidenden Reaktionsparameter abzulesen:

- 1) Einheitlichkeit der Reaktion
- 2) Umsatzgeschwindigkeit
- 3) Einfluß von Lösungsmittel
- 4) pH-Wert
- 5) optimales Konzentrationsverhältnis von Substrat zum Deazaflavin.

Wenn die frei wählbaren Parameter bei diesen Reaktionen so ausgesucht werden können, daß eine möglichst hohe Umsatzgeschwindigkeit und vielleicht sogar Einheitlichkeit einer

Reaktion erreicht wird, dann ist es möglich, Photoreaktionen in präparativem Maßstab durchzuführen, d.h. die Reduktionsprodukte zu isolieren und deren Struktur aufzuklären. Im folgenden Abschnitt werden solche kinetischen Untersuchungen für die Deazaflavinreihe beschrieben.

2.3.1. Wahl des Lösungsmittels

Flavinphotoreduktionen werden in den bisherigen Arbeiten im allgemeinen in zwei Lösungsmitteln durchgeführt, nämlich in Acetonitril und in Wasser. (Vergleiche Photoreaktionen des Flavins^{33,35}.) Beide bieten für eine bestimmte Art von Reaktionen Vorteile, auf die hier kurz hingewiesen werden soll. In Acetonitril sind viele organische Substrate besser löslich als in Wasser, außerdem ist die Mischbarkeit mit Wasser, Alkoholen, Äthern und Kohlenwasserstoffen ausgezeichnet. Es zeigt sich weiterhin, daß in Acetonitril die Hydratation z.B. von Phenylglyoxylsäure aufgehoben ist und dadurch dieses Substrat ähnlich wie beim Flavin besser reagiert als in Wasser.

Auf der anderen Seite bietet Wasser den Vorteil, daß die verwendeten Carbonsäuren in diesem Lösungsmittel besser löslich sind. Durch Veränderung des pH-Wertes ist es möglich, bei den Substraten zu untersuchen, ob die freie Säure oder das deprotonierte Carboxylatanion die reaktive Spezies für die Photoreaktionen ist. Auf diesen Hintergrund wird weiter unten noch eingehender hingewiesen.

2.3.2. Reaktionen in Wasser

2.3.2.1. Die reaktive Spezies in Photoreaktionen: Das Deazaflavintriplett

Eine Substratklasse, die bei Photoreduktionen eingesetzt werden, sind, wie unter 2.3. schon erwähnt, aliphatische

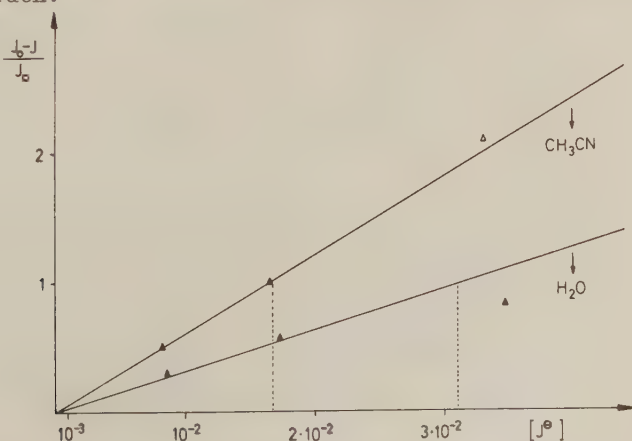
sowie aromatische Carbonsäuren. Solche Carbonsäuren reagieren mit dFl_{ox} in Wasser bei verschiedenen pH-Werten photochemisch unter Decarboxylierung und gleichzeitiger Dehydrierung. Die reaktive Spezies ist das Deazaflavintriplett, was durch Zugabe von Jodid bewiesen wurde. Es gibt bekanntlich mehrere Möglichkeiten, Fluoreszenz und Phosphoreszenz zu löschen, und zwar durch Sauerstoff, mit Hilfe von Jodiden und durch paramagnetische Ionen. Dabei wird die Anregungsenergie auf diese "Löschsubstanzen" übertragen und so eine strahlungslose Desaktivierung der angeregten Zustände erreicht. Bei der Reaktion gegenüber Singulett- und Triplettzuständen gibt es allerdings Unterschiede. Schon bei einer geringen Jodid-Konzentration wird die Phosphoreszenz gelöscht, die Fluoreszenz aber nur in ganz beschränktem Maß verringert. Steigert man hingegen die Jodid-Konzentration, so wird auch die Fluoreszenz gelöscht. Diese Abhängigkeit der Fluoreszenz von der Jodid-Konzentration wird experimentell bestimmt.

Aus der STERN-VOLMER Darstellung

$$\frac{I_0 - I}{I} = k(J^-)$$

kann die Geschwindigkeitskonstante der Fluoreszenzlöschung errechnet werden.

Abbildung 1:



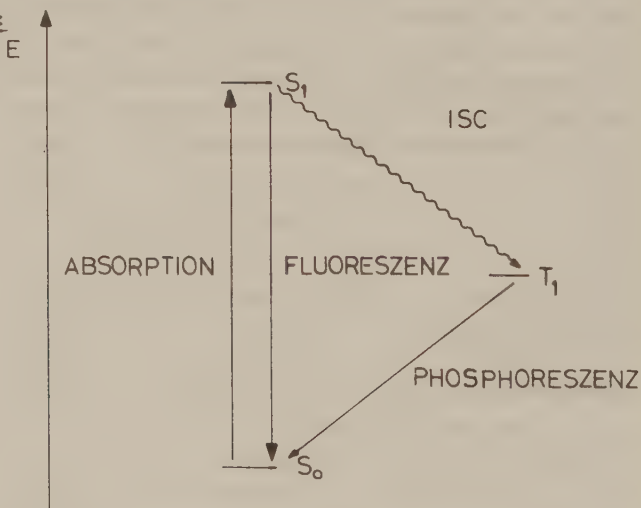
Löschung der Fluoreszenz des 5-Deazaalloxazins 1 ($\lambda_{max}(H_2O)=455$ nm, $\lambda_{max}(CH_3CN)=452$ nm) durch $NET_4^+ J^-$ bei 23°C. (Konzentration an $dFl_{ox} \sim 5 \cdot 10^{-5}$ M)

Für die Lösungsmittel Wasser und Acetonitril ergeben sich bei Raumtemperatur folgende Werte für die Halblösungskonzentration an Jodid: Wasser: $3,1 \cdot 10^{-2}$ M; Acetonitril: $1,7 \cdot 10^{-2}$ M.

Da allerdings die Bruttoreaktionsgeschwindigkeiten von einigen ausgewählten Beispielen schon bei geringer Jodidkonzentration ($10^{-3} - 10^{-4}$ M) erheblich vermindert werden, muß man daraus schließen, daß die Photoreaktionen über den Triplettzustand des Deazaflavins verlaufen, der bei diesen niedrigen Jodidkonzentrationen bereits gelöscht ist.

Ein modifiziertes JABLONSKI Schema für Deazaflavin müßte qualitativ folgendes Aussehen haben.

Abbildung 2:



Für das Flavinmolekül wurden die Energien von SONG⁸⁴⁾ bereits berechnet, sie betragen beim $S_1 - S_0$ Übergang 57.8 kcal/Mol und beim $T_1 - S_0$ Übergang 50.0 kcal/Mol. Für die Deazaflavinreihe kann der $S_1 - S_0$ Übergang aus den Fluoreszenzspektren berechnet werden, die Energie liegt bei 62,9 kcal/Mol. Die Energie des Triplettüberganges wurde für Deazaflavine nicht bestimmt.

2.3.2.2. Photoreaktionen mit Carbonsäuren

Wie unter 2.3.2.1. erwähnt, reagieren sowohl aliphatische wie aromatische Carbonsäuren in der Flavinreihe unter gleichzeitiger Photodehydrierung und Photodecarboxylierung. Wie weiter unten gezeigt, ergibt sich bei den Deazaflavinen ein ähnlicher Reaktionsverlauf. Die folgende Tabelle zeigt die experimentellen Bedingungen und die relativen Umsatzgeschwindigkeiten, mit denen diese Carbonsäuren mit dem Deazaflavintriplett reagieren.

Tabelle 6:

Substrat	V _{rel} (bei Stand.beding.)		V _{rel} (dopp. Substratkonz.)		End- produkt
	pH=4	pH=8	pH=4	pH=8	
Oxalsäure	200	-	600	300	Dim
Malonsäure	-	-	60	25	Dim
3-Butinsäure	6	15	-	-	Dim
Brenztraubensäure	10	-	-	100	Dim
Pivalinsäure	150	200	-	-	Dim
Glycin	-	600	1	1 000	Dim
N.N-Dimethylglycin	20	300	-	-	Dim
EDTA	40	750	-	-	Dim
Phenylelessigsäure	-	-	4,5	11	Add?
p-Tolylessigsäure	-	-	15	100	Add?
Pentamethylphenylelessigsäure	-	-	450	1 000	Add?
2-Phenyl-propionsäure	-	-	20	30	Add?
Mandelsäure	360	30	820	600	Dim
O-Methylmandelsäure	-	180	360	450	Dim
α -Deuterio-O-methylmandelsäure	-	180	-	-	Dim
Phenoxyessigsäure	-	-	30	50	Add
Phenylglyoxylsäure	-	-	1	-	?
Mandelsäureäthylester	-	-	1	-	?

Standardbedingungen	Puffer	0.1	1 ml/Küvettenansatz
K ₁ Filter	dFl _{ox}	10 ⁻⁴	1 ml/ "
anaerob/Argon	Substrat	0.02 M	0.5 ml/ "

zu Tab. 6: Relative Umsatzgeschwindigkeiten V_{rel} bezogen auf eine langsame Reaktion (Substrat: Glycin bei pH = 4 doppelte Substratkonzentration), deren Geschwindigkeit (Zeit für die Umsetzung der Hälfte an dFl_{ox}) gleich 1 gesetzt wird. Alle anderen Umsatzgeschwindigkeiten werden auf diese Reaktion bezogen.

Aus dieser Tabelle sieht man deutlich, daß eine Substratkonzentrationsabhängigkeit besteht, die aber nicht unbedingt linear ist. Die Sättigungskonzentration, an der sich die Reaktionsgeschwindigkeit nicht mehr ändert, wurde nicht experimentell bestimmt. Weiterhin ist eine pH-Wert Abhängigkeit zu erkennen. Für die einzelnen Substrate läßt sich diese Tatsache folgendermaßen erklären.

Oxalsäure ebenso wie Malonsäure reagiert bei gleicher Substratkonzentration bei pH = 4 schneller als bei pH = 8. Es scheint also, daß das Monoanion, welches bei pH = 4 hauptsächlich vorliegt, gegenüber der voll deprotonierten Spezies das reaktivere Agens ist. Ebenso reagieren die meisten Monocarbonsäuren aliphatisch (sowohl aromatisch wie aliphatisch) bei pH = 8 schneller. Auch hier liegen bei pH = 8 die Anionen vor, die das Deazaflavintriplett leichter angreifen können als die freie Säure.

In ähnlicher Art wie die besprochenen Carbonsäuren reagieren auch einige Aminosäuren. Bemerkenswert ist die erstaunlich große pH-Wert Abhängigkeit der Reaktion. Am isoelektrischen Punkt³⁵⁾, der in den betrachteten Fällen in der Gegend von pH = 4 liegt, reagiert das Zwitterion der Aminosäure nur sehr langsam mit dem Deazaflavintriplett, erst bei pH-Erhöhung, d.h. bei Bildung des Aminosäureanions, findet ein drastisches Ansteigen der Umsatzgeschwindigkeit statt. Wenn man das mit Flavin vergleicht, scheint es sich um völlig analoge Reaktionen zu handeln, da auch dort das im Tripletzustand elektronendefiziente Flavin nucleophil von den Substraten angegriffen wird. Im Gegensatz zur 4a-Stellung im Flavin ist allerdings im Deazaflavin die 5-Stellung das elektrophile Zentrum¹²⁾, so daß die

Additionen nicht in 4a-Stellung, sondern in 5-Stellung erfolgen sollten. Elektronendichteberechnungen von SONG¹²⁾ zeigen, daß die 5-Stellung für ein eintretendes Nucleophil am besten geeignet ist, was die mesomeren Grenzformeln für oxidiertes Deazaflavin durch eine positive Teilladung in 5-Stellung veranschaulichen (s.S.98). Die relative Umsatzgeschwindigkeit hängt neben der Substratkonzentration und dem pH-Wert auch von der Natur der eingesetzten Carbonsäure ab. Ein Beispiel dafür ist die Phenylelessigsäure und deren Derivate. Wie bei ähnlichen Reaktionen in der Flavinreihe³²⁾ wird beim Übergang auf kernmethylierte Substrate die Umsatzgeschwindigkeit erhöht.

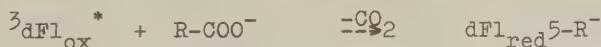
In der Flavinreihe wurde diese Beobachtung mit der Bildung stabilerer hydrophober Komplexe interpretiert. Die Erhöhung der Quantenausbeute und damit die schnellere Reaktion scheint auch in der Deazaflavinreihe auf das gleiche Phänomen zurückzuführen zu sein.

Auf Grund dieser Tatsachen ist es möglich, einen Reaktionsverlauf für die deazaflavinabhängige Photooxidation von Carbonsäuren zu formulieren.

- 1) Photochemische Bildung des Deazaflavinsingulettts mit anschließendem "Intersystem crossing" zum reaktiven Deazaflavintriplett:



- 2) Nucleophile Addition des Substratrestes an das im Tripletzustand elektronendefiziente Deazaflavin unter gleichzeitiger Decarboxylierung (wahrscheinlichster Ort der Addition ist die elektronenarme 5-Position):



Den bekannten Reaktionen folgend, sollten nun zwei Arten der Weiterreaktion möglich sein, wenn ein solches Addukt nicht faßbar ist:

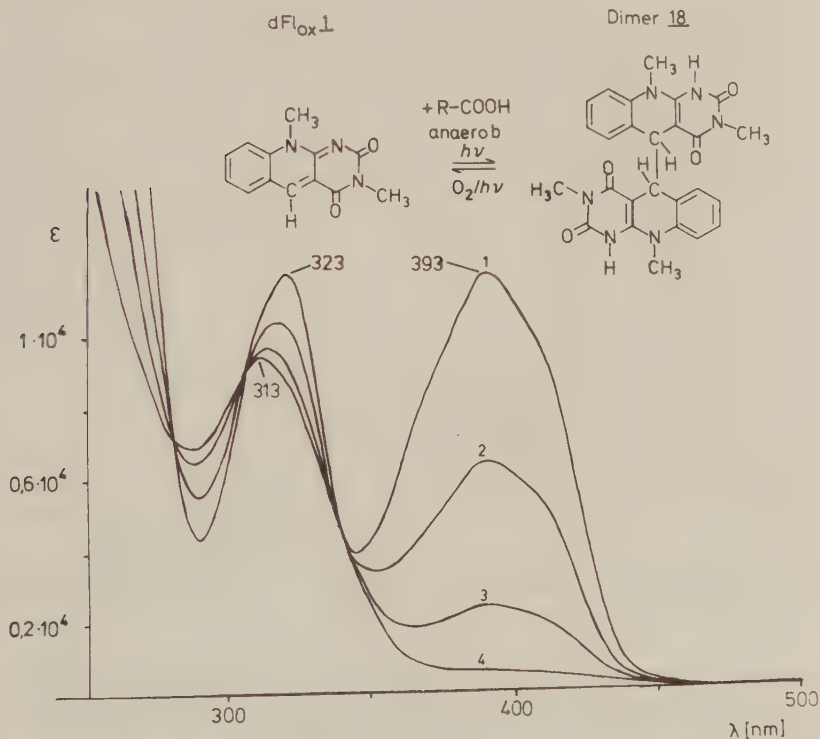
- a) In der Flavinreihe werden solche zunächst gebildeten Primäraddukte in vielen Fällen unter Abspaltung des oxidierten Restes in das vollständig reduzierte Flavin $\text{Fl}_{\text{red}}\text{H}_2$ überführt, welches seinerseits spektral leicht charakterisiert werden kann³²⁾.
Ein analoges reduziertes Deazaflavin ist durch Dunkelreduktionen mit Dithionit oder Borhydrid leicht zu erhalten (siehe Seite 20) und kann somit als Vergleichssubstanz für ein photochemisch dargestelltes Endprodukt dienen.
- b) In der Acridin- und Chinolinreihe (Deazaflavin stellt durch den mittleren Pyridinring ein teilweise acridin- bzw. chinolinanaloges System dar) sind neben der auch dort vorkommenden Reaktion zur vollständig reduzierten Stufe auch andere Reaktionen beobachtet worden⁸⁵⁻⁹¹⁾. Es wird dort ein auf einer mittleren Oxidationsstufe stehendes Dimeres gebildet. Ein solcher Reaktionsverlauf wäre auch in der Deazaflavinreihe denkbar. Das in der Reaktion 2) gebildete Addukt könnte in einer zweiten nucleophilen Reaktion mit einem zweiten Molekül Deazaflavin unter Abspaltung des Restes R^+ ein Dimeres bilden. Wahrscheinlichster Verknüpfungspunkt der beiden Deazaflavinhälften wäre die elektronenarme 5-Position. Diese entspricht der 9-Position in der Acridinreihe, in der solche 9.9'-Dimere beobachtet werden^{86,87,88,89,91)}.

Auf Grund der kinetischen Untersuchungen gilt es nun zwischen diesen drei möglichen Reaktionswegen zu unterscheiden.

- 1) Addukt (sicherlich nicht wie in der Flavinreihe 4a-, sondern 5-Addition)
- 2) $1.5\text{-H}_2\text{dFl}_{\text{red}}$ (flavinanalog)
- 3) Dimer (wahrscheinlich 5,5'-Dimer, acridinanalog)

Der Vergleich der Elektronenspektren der Photoreaktionen mit verschiedenen Substraten zeigt, daß bei den meisten Photoreaktionen nur zwei unterschiedliche Reaktionsverläufe zu beobachten sind. (Abbildung 3 und 4)

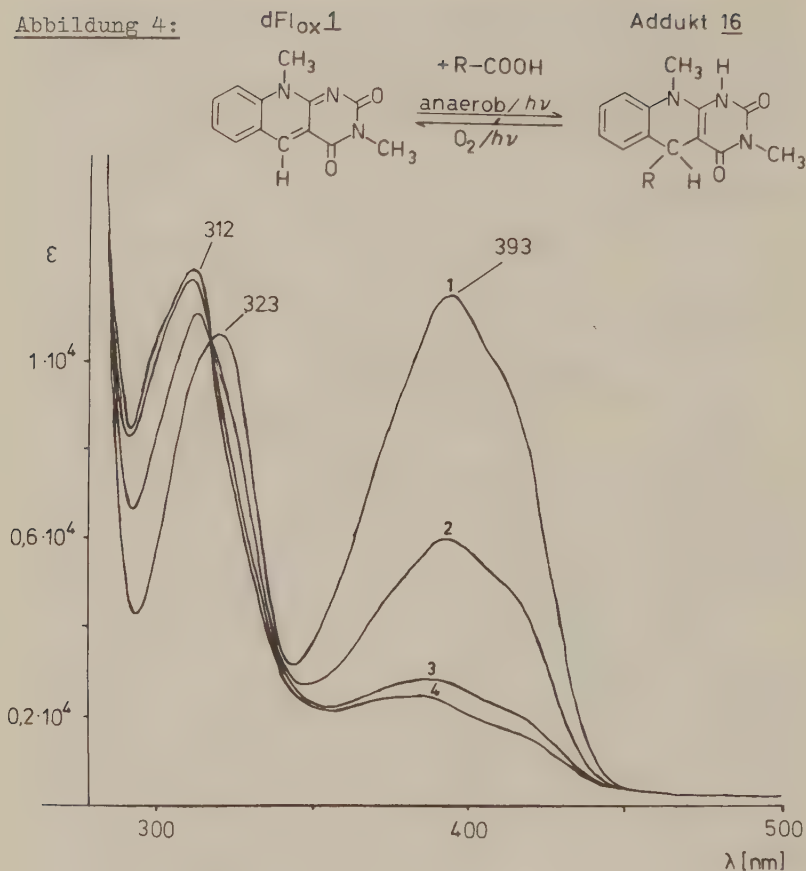
Abbildung 3:



Photoreduktion von dFl_{ox} 1 (10^{-4} M) mit Oxalsäure (0.02 M) in Wasser bei pH = 8 (Phosphat-Puffer 0.1 M) unter Sauerstoff-Ausschluß in einer 1 cm Thunberg-Küvette (siehe auch experimenteller Teil).

Bestrahlungsdauer: Kurve 1 = 0 sec, Kurve 2 = 50 sec,
 Kurve 3 = 200 sec, Kurve 4 = 800 sec.

Abbildung 4:



Photoreduktion von dFl_{ox} 1 (10^{-4} M) mit Phenoxyessigsäure (0.02 M) in Wasser bei pH = 8 (Phosphat-Puffer 0.1 M) unter Sauerstoff-Ausschluß in einer 1 cm Thunberg-Küvette. Bestrahlungsdauer: Kurve 1 = 0 sec, Kurve 2 = 200 sec, Kurve 3 = 1000 sec, Kurve 4 = 1500 sec.

Bei diesen Photoreduktionen entsteht in beiden Fällen ein Chromophor, der dem durch Dunkelreduktion erhaltenen $dFl_{red}H_2$ 9 sehr ähnlich sieht. Es ist aber weiterhin festzustellen, daß die Absorptionsmaxima der Photoprodukte gegenüber 9 leicht hypsochrom verschoben sind. Diese Tatsache gibt schon einen deutlichen Hinweis, daß das vollständig reduzierte Deazaflavin kein Endprodukt innerhalb der deazaflavinabhängigen Photoreaktionen darstellt. In den Extinktionen unterscheidet sich das Produkt aus Abbildung 3 und 9 ebenfalls erheblich (7500 : 12000), hingegen zeigt das zweite Produkt (Abbildung 4) einen etwa gleichen Extinktionskoeffizienten. Neben dem durch die Elektronenspektren ermittelten etwa gleichen Chromophor, weisen auch etwa gleiche pK-Werte (potentiometrisch ermittelt)

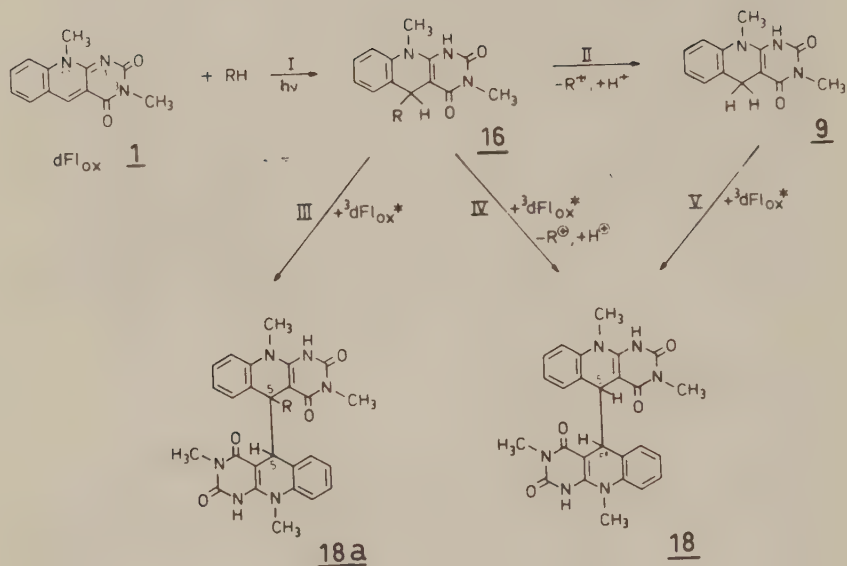
a) $dFl_{red}H_2$	7.4
b) Abbildung 3	7.9
c) Abbildung 4	8.0

auf ein ähnliches Grundgerüst der drei Spezies hin.

Da $dFl_{red}H_2$ mit hoher Wahrscheinlichkeit nicht als Photoendprodukt in Frage kommt, bliebe bei den beiden erhaltenen Spezies nur noch zwischen Dimer und Addukt zu unterscheiden, und diese Produkte den Spektren zuzuordnen.

Diese Zuordnung ist ohne weitere experimentelle Daten schwierig und nur vorläufig zu treffen. Da es sich bei dem Addukt um ein dem $dFl_{red}H_2$ strukturell sehr verwandtes Molekül handelt, ist anzunehmen, daß das Addukt eine etwa gleiche Übergangswahrscheinlichkeit, d.h. etwa gleiche Extinktionen wie die vollständig reduzierte Spezies haben sollte. Damit käme dem Addukt ein Spektrum, wie es Abbildung 4 zeigt, zu. Ob ein solches Addukt auf dem Reaktionsweg eines postulierten Dimers liegt, bleibt zunächst noch eine Arbeitshypothese, auf Grund dieser Hypothese läßt sich aber ein Reaktionsschema entwickeln, das einen möglichen Verlauf der deazaflavinabhängigen Photoreduktion zeigt.

Scheme 2



Wenn die 7.8-Stellung dieser Verbindungen mit je einer Methylgruppe substituiert ist, haben die Verbindungen andere Numerierungen.

7.8=H 7.8=CH₃

1 $\cong$ 5
 9 $\cong$ 11
 16 $\cong$ 17
 18 $\cong$ 19
 18a $\cong$ 19a

Schema 2 greift die beiden am Beginn dieses Kapitels schon formulierten Reaktionsstufen wieder auf, und beschreibt unter

- I) die Adduktbildung des Deazaflavintripletts mit dem Substratrest. In der Weiterreaktion des Adduktes 16 werden mehrere Möglichkeiten beschrieben, die alternativ oder gleichzeitig ablaufen können.
- II) Abspaltung des Substratrestes als Kation (thermisch oder photochemisch bedingt) und Aufnahme eines Protons unter Bildung der bekannten vollständig reduzierten Spezies $dFl_{red}H_2$ 9.
- III) Abspaltung eines Protons und gleichzeitige Reaktion mit dem Deazaflavintriplett unter Bildung eines dimeren Deazaflavins 18a.
- IV) Abspaltung des Substratrestes als Kation und gleichzeitige Reaktion mit dem Deazaflavintriplett unter Bildung eines Dimeren 18.
- V) Photokomproportionierung des im Dunkeln gebildeten $dFl_{red}H_2$ 9 mit dem Deazaflavintriplett unter Bildung des gleichen Dimeren 18 wie unter IV.

Aus Schema 2 kann abgeleitet werden, daß drei mögliche Endprodukte bei deazaflavin-abhängigen Photoreduktionen entstehen können:

- 1) Ein Addukt 16, welches bei genügender Stabilität durch Reaktion über den Weg I isoliert werden könnte.
- 2) Das Dimer 18, welches
 - a) über die Reaktionswege I und IV und
 - b) über die Reaktionswege I, II und V entstehen könnte.
- 3) Ein "gemischtes" Dimeres 18a über die Reaktionswege I und IV.

Welche dieser Reaktionsmöglichkeiten wirklich eine Rolle spielen, ist zunächst unbewiesen, der tatsächliche Verlauf wird an Hand von weiterführenden Experimenten noch gezeigt werden (siehe Seite 84).

2.3.2.3. Photoreaktionen mit Alkoholen in basischem Milieu

Neben Carbonsäuren reagieren auch andere Substrate im wässrigen Milieu mit dem Deazaflavintriplett. Besonders die Alkohole werden hierbei untersucht. Es zeigt sich, daß bei verschiedenen Alkoholen im basischen Milieu mehrere Reaktionen überlagert sind⁹²⁻⁹⁴⁾. Deazaflavine zeigen neben den in Tabelle 7 aufgeführten Lichtreaktionen auch Dunkelreaktionen mit diesen Substraten^{92,93)} und Hydrolysereaktionen⁹⁴⁾ in diesem hohen pH-Bereich. Die Lichtreaktionen sind die schnelleren Reaktionen, und sogar so schnell, daß die konkurrierenden Dunkelreaktionen keine Rolle für die Reaktionsgeschwindigkeit und die auftretenden Produkte spielen. Zusammengefaßt sind die Experimente in der nachfolgenden Tabelle 7. Dabei wird neben der Variation des Substrates auch die Basizität der Lösung verändert und die relativen Umsatzgeschwindigkeiten bestimmt.

Tabelle 7:

Substrat	pH-Wert			
	13	11	9	7
MeOH	12	4.5	1	---
EtOH	28	---	---	---
IsOH	70	---	---	17.5
tert. BuOH	4	---	---	---

Die relativen Umsatzgeschwindigkeiten sind bezogen auf die Reaktion mit Methanol bei pH = 9. Diese wurde gleich 1 gesetzt.

Reaktionsbedingungen

K₁-Filter, anaerob / Argon

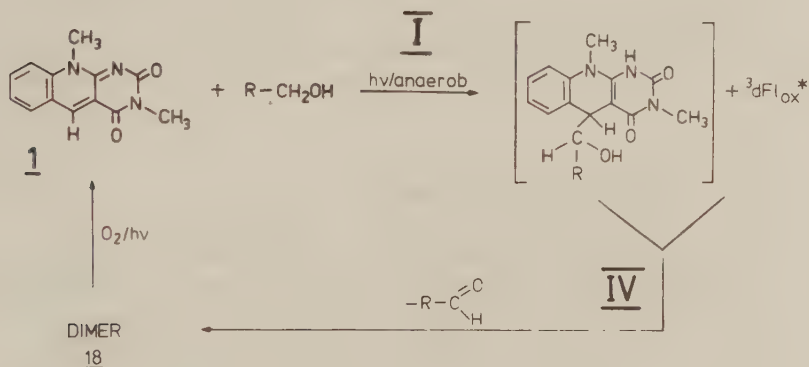
0.1 N NaOH bzw. Puffer des entsprechenden pH-Wertes /

50 % Substrat als Lösungsmittel

(dFl_{ox}) = 10⁻⁴ Mol/l

In anaeroben Photoreaktionen werden Substrate vom Typ R-OH dehydriert. Allerdings wird nicht wie bei Flavinen³³⁾ das 1.5-Dihydroderivat gebildet, sondern es zeigen sich Absorptionsspektren wie in Abbildung 3, die auf das postulierte Dimere 18 hindeuten. Schema 3 zeigt für die Reaktion mit Alkoholen, die im allgemeinen Schema 2 (siehe Seite 40) ausgeführten Reaktionsschritte I und IV unter Bildung des Dimeren 18.

Schema 3:



Der Reaktionsverlauf unterscheidet sich nur unwesentlich von dem der Carbonsäuren (siehe Seite 40). Das Addukt konnte hier in keinem Fall experimentell belegt werden, es scheint aber die plausibelste Erklärung für die Dimerbildung der deazaflavin-abhängigen Alkoholphotodehydrierung zu sein. Bei neutralem pH-Wert reagiert nur Isopropanol schnell unter Photooxidation zu Aceton. Durch Erhöhung des pH-Wertes werden die anderen Substrate soweit aktiviert, daß ebenfalls eine nucleophile Addition an das elektronendefiziente Deazaflavintriplett möglich wird. Die Abhängigkeit der Umsatzgeschwindigkeiten vom pH-Wert,

welche für Methanol als Substrat gezeigt wird, macht das deutlich. So unterscheiden sich die Reaktionen bei $\text{pH} = 9$ und $\text{pH} = 13$ um den Faktor 10. In reinem Methanol spielt die Photoreaktion überhaupt keine Rolle mehr, wie in einer Blindprobe gezeigt werden konnte.

Im Gegensatz zu Flavinen³⁵⁾ vergrößert sich die Umsatzgeschwindigkeit beim Übergang von primären zu sekundären Alkoholen. So reagiert Isopropanol um den Faktor 6 schneller als Methanol. Tertiäres Butanol reagiert dagegen wesentlich langsamer, wie aus Tabelle 7 abzulesen ist.

Diese Photoreaktionen sind nun von Dunkelreaktionen bei hohem pH-Wert begleitet^{92,93)}. In einer Nachfolgearbeit wird darüber ausführlich berichtet⁹⁴⁾.

2.3.3. Reaktionen in Acetonitril

Wie unter 2.3.1. erwähnt, werden neben wässrigen Lösungen auch aprotische Lösungsmittel für photochemische Reaktionen verwendet. Prototyp dieser Lösungsmittel ist Acetonitril; die schon erwähnten Vorteile tragen zur guten Verwendbarkeit bei. Organische mit Wasser nicht mischbare Substrate werden in Acetonitril mit $^3\text{dFl}_{\text{ox}}^*$ umgesetzt.

2.3.3.1. Ungesättigte Kohlenwasserstoffe

In Analogie zu Flavinreaktionen^{33,68)} werden nur einige ausgewählte Substrate umgesetzt, zu ihnen gehören die cyclischen ungesättigten Kohlenwasserstoffe. Tabelle 8 zeigt die Substrate mit den relativen Umsatzgeschwindigkeiten.

Tabelle 8:

Substrat

Cyclopentadien	86
1.4-Cyclohexadien	400
Cycloheptatrien	200

Reaktionsbedingungen

K₁-Filter, anaerob / Argon

(dFl_{ox}) = 10⁻⁴ Mol/l

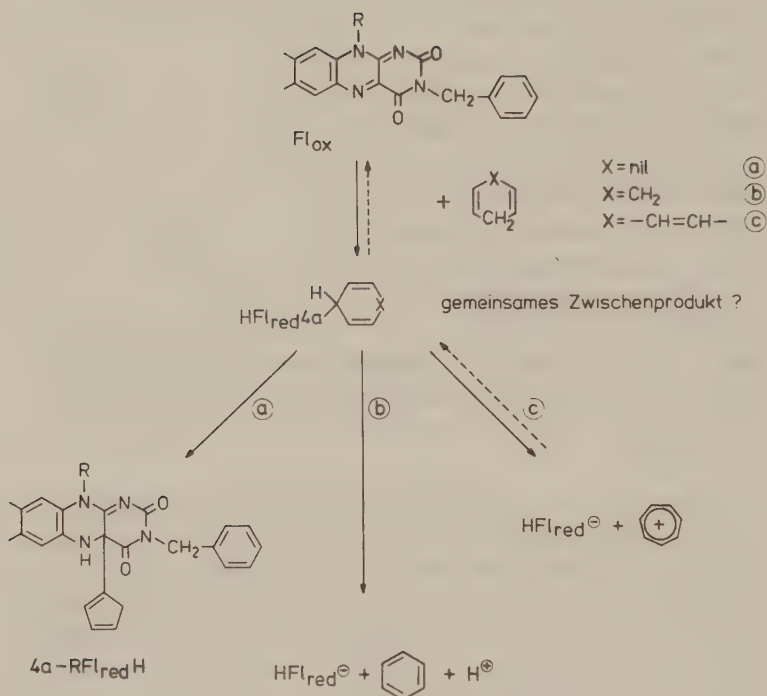
(Substrat) = 10⁻² Mol/l

Umsatzgeschwindigkeiten bezogen auf die Reaktion mit Benzaldehyd. Die Geschwindigkeit dieser Reaktion, die aber nur zum Vergleich ausgeführt wurde, wurde gleich 1 gesetzt.

Diese Kohlenwasserstoffe reagieren in der Flavinreihe nach Reaktionsschema 4⁶⁸⁾. Im Falle des Cyclopentadiens kann ein 4a-Addukt (Schema 4) gefaßt werden, während bei 1.4-Cyclohexadien ein vermeintliches Zwischenprodukt sofort und irreversibel zu Benzol und 1.5-Dihydroflavin zerfällt. Inzwischen konnte gezeigt werden⁹⁵⁾, daß bei substituierten Cyclohexadienen als Substrate (z.B. 3.3-Dimethyl-1-phenyl-1.4-cyclohexadien) bei Temperaturen um -40° C 4a-Addukte gebildet werden können. Es ist anzunehmen, daß auch unsubstituiertes 1.4-Cyclohexadien nach diesem Mechanismus reagiert, auch wenn selbst bei -80° C keine Adduktbildung, sondern nur Bildung von 1.5-Dihydroflavin nachgewiesen werden konnte.

Cycloheptatrien reagiert zunächst analog dem Cyclohexadien, jedoch ist diese Reaktion reversibel, da das sich bildende Tropylium-Kation resonanzstabilisiert ist und sekundäre Zerfallsreaktionen nur langsam eingeht. Dieses Tropylium-Kation geht dann eine Rückreaktion im Dunkeln mit Fl_{red}^{H-} ein, unter Bildung von Cycloheptatrien und Freisetzung des Startmaterials Fl_{ox}.

Schema 4:

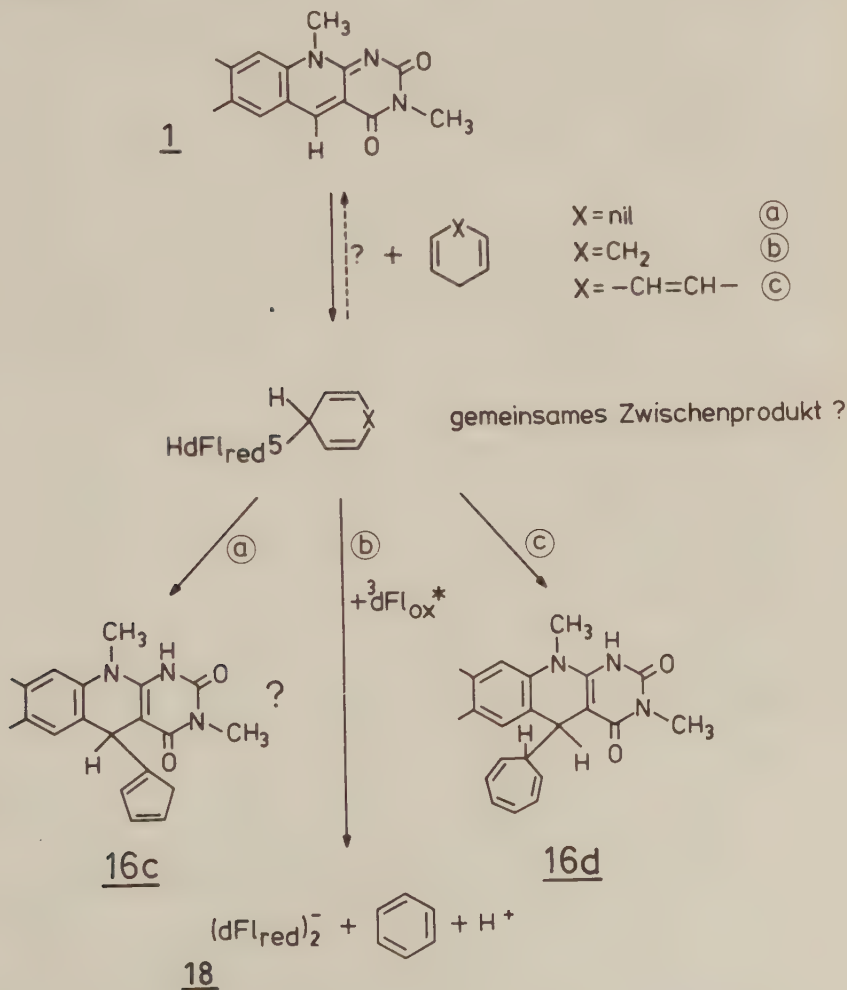


Für die Deazaflavin-Serie stellt sich die Photoreaktion mit Cycloolefinen anders dar. Durch Reaktionsschema 5 soll verdeutlicht werden, was an Hand der unten stehenden Absorptionsspektren (Abbildung 5 und 6) gezeigt werden kann.

Cyclopentadien reagiert analog zum Flavin, nur daß - wie schon bei den Carbonsäuren beobachtet - nicht ein 4a-Addukt, sondern ein 5-Addukt gebildet wird. Wie in der Flavinreihe ist die Adduktstufe stabil, da der Rest R = C₅H₅⁺ antiaromatisch ist, wodurch der Zerfall bzw. die Weiterreaktion mit ³dFl_{ox}^{*} energetisch ungünstig ist. Ob es zu Valenzisomerisierung wie in der Flavinserie kommt, ist nicht festzustellen,

da das zwar unter analytischen Bedingungen charakterisierte 5-Addukt 16c bisher präparativ nicht faßbar ist, so daß eine genaue Strukturaufklärung nicht möglich ist.

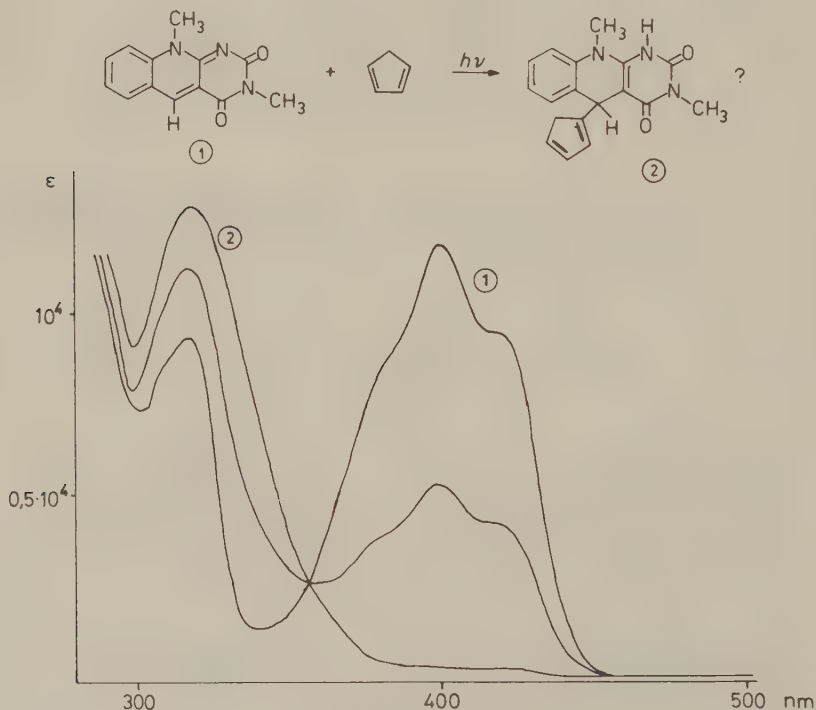
Schema 5:



(Schema 5 ist eng an Schema 4 angelehnt)

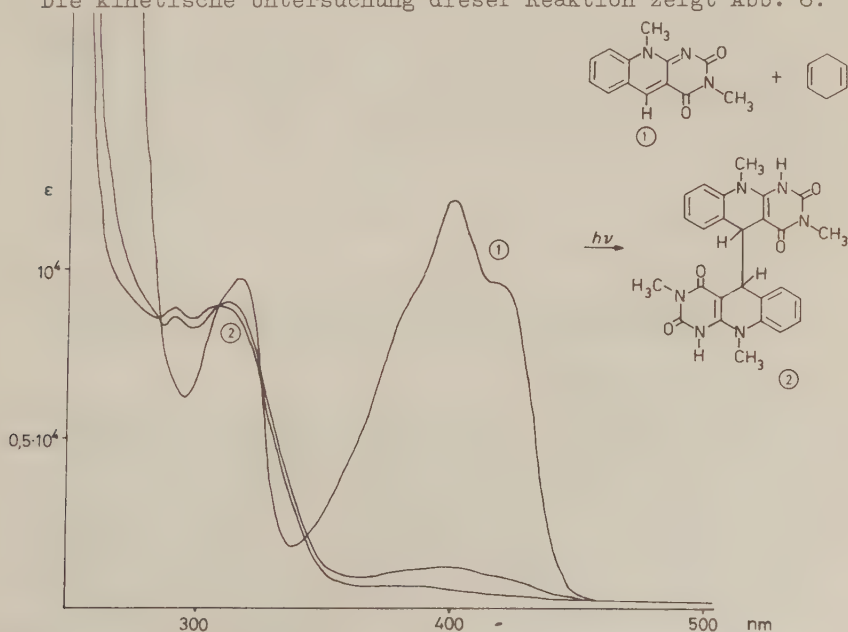
Die Addition des Cyclopentadiens wird durch die Absorptionsspektren deutlich (Abb. 5). Bei Bildung eines Adduktes erhöht sich der Extinktionskoeffizient von ca. $10\ 000$ für dFl_{ox} im Bereich um 320 nm in Acetonitril auf ungefähr $13\ 000$ für das Addukt mit leicht hypsochromer Verschiebung auf 308 nm . (s. Kurve 2). Dieser Verlauf ist schon durch Abbildung 4 dokumentiert worden, und wurde dort zunächst einer Adduktbildung zugeordnet (s. S. 38).

Abbildung 5:



Photoreduktion von dFl_{ox} ① ($10^{-4}M$) mit Cyclopentadien ($10^{-2}M$) in Acetonitril unter Sauerstoff-Ausschluß in einer 1 cm Thunberg-Küvette.
 Bestrahlungsdauer: Kurve 1 = 0 sec, mittlere Kurve = 80 sec
 Kurve 2 = 420 sec.

Cyclohexadien liefert in einer anaeroben Photoreaktion das schon beschriebene Dimer 18, ohne daß ein Zwischenprodukt gefaßt werden konnte. Es erscheint aber trotzdem als gesichert, daß ein obiges Zwischenprodukt (welches auch thermisch in 1.5-Dihydrodeazaflavin und Benzol zerfallen könnte) durchschritten wird, welches dann unter Photokomproportionierung mit $^3\text{dFl}_{\text{ox}}^*$ das Dimere 18 bilden könnte. Der Mechanismus ist analog zu den schon betrachteten Carbonsäuren (s.S. 40), denn bei Cyclohexadien als Substrat ist leicht einzusehen, daß die Dimerbildung aus Addukt und $^3\text{dFl}_{\text{ox}}^*$ bevorzugt ist. Der Rest R kann sich in diesem Fall durch Abspaltung eines Protons zu Benzol stabilisieren, wodurch das Gleichgewicht auf die Seite der Dimerbildung gedrängt wird. Auch bei noch so kurzer Bestrahlungszeit und bei tiefer Temperatur (-40°C) war es nicht möglich, die Adduktstufe zu fassen und spektral zu charakterisieren. Die kinetische Untersuchung dieser Reaktion zeigt Abb. 6:



Photoreduktion v. $\text{dFl}_1 (10^{-4}\text{M})$ mit 1.4-Cyclohexadien (10^{-2}M) in Acetonitril unter Sauerstoff-Ausschluß in einer 1cm Thunberg-Küvette.
Bestrahlungsdauer: Kurve 1 = 0 sec, mittlere Kurve = 90 sec,
Kurve 2 = 500 sec

Hier sieht man deutlich, wie schon bei der Reaktion mit Oxalsäure (siehe Seite 37), daß bei Dimerbildung, welche hier durch spektroskopische Charakterisierung des Endproduktes bewiesen werden konnte, der Extinktionskoeffizient im Bereich um 320 nm nicht wie bei Adduktbildung zunimmt, sondern auf ein Mol dFl_{ox} bezogen bei gleichzeitiger hypsochromer Verschiebung auf 310 nm abnimmt. Bei allen Reaktionen, die einen solchen Verlauf zeigen, ist eine Dimerbildung anzunehmen. Dieser Verlauf entspricht auch der Abbildung 3 (siehe Seite 37).

Cycloheptatrien reagiert analog dem Cyclopentadien unter Adduktbildung in der 5-Position des Deazaflavins. Obwohl der Rest R leicht als aromatisches Tropylium-Kation abgespalten werden könnte, so wie es in der Flavinreihe auch beobachtet wird⁶⁸⁾, kann eine derartige Weiterreaktion unter möglicher Dimerenbildung nicht beobachtet werden. Die Reaktion bleibt auf der Adduktstufe stehen, und es ist möglich, ein 5-substituiertes Dihydrodeazaflavin 16d zu isolieren und dessen Struktur aufzuklären (Seite 68). Dieses Tropylium-Addukt 16d ist sehr stabil und reagiert, ebenso wie das Phenoxyessigsäure-Addukt 16b, photochemisch nur sehr langsam mit $^3dFl_{ox}^*$ (Seite 73).

2.4. Isolierung von einigen ausgewählten Endprodukten

2.4.1. Dimerisierung

Wie schon mehrfach im Rahmen der kinetischen Untersuchungen erwähnt, kann als Endprodukt in der Reaktion von $^3dFl_{ox}^*$ mit vielen wasserstoffübertragenden Substraten ein dimeres Dihydrodeazaflavin 18 entstehen. Das allgemeine Reaktionsschema 2 zur Bildung dieses Dimeren wurde schon diskutiert, im Rahmen dieses Teiles sollen nun Strukturaufklärung und die Reaktionen der Endprodukte der Photoreaktionen besprochen werden.

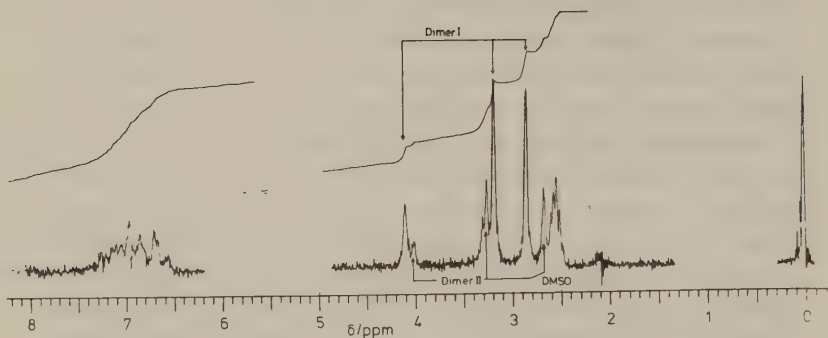
Bei der Bildung von 18 in einer isosbestischen Reaktion (siehe Seite 37) entsteht ein Chromophor, der bei 313 nm absorbiert. Durch Dunkelreduktionen wurde gezeigt, daß das dabei entstehende 1.5-Dihydrodeazaflavin 9 ebenfalls in dieser Gegend absorbiert, und zwar bei 316 nm (pH = 7). Diese chromophoren Systeme unterscheiden sich damit in der Lage nur unwesentlich, allein die molaren Extinktionskoeffizienten zeigen einen signifikanten Unterschied. Während man bei Dunkelreduktionen eine leichte Zunahme der Extinktion und hypsochrome Verschiebung des Maximums bei 323 nm beobachtet ($\epsilon = 12.000$), zeigt sich bei Bildung des Dimeren eine deutliche Abnahme von ($\epsilon = 7.500$). Damit erhält man bei jeder Photoreduktion schon aus dieser Extinktionsabnahme einen deutlichen Hinweis auf die Bildung von Dimer 18. Es war nun im Rahmen dieser Arbeit möglich, diese Spezies aus verschiedenen Reaktionen zu isolieren.

Tabelle 9:

1)	dFl _{ox}	+ Oxalsäure	--->	Dimer
	(a)	pH = 4		
	(b)	pH = 8		
2)	dFl _{ox}	+ EDTA	--->	Dimer
3)	dFl _{ox}	+ Cyclohexadien	CH ₃ CN --->	Dimer
4)	dFl _{ox}	+ CH ₃ OH / pH = 13	--->	Dimer

Bei diesen Umsetzungen wurde ein Produkt gewonnen, das folgendes NMR-Spektrum zeigte (siehe Abbildung 7).

Abbildung 7:



^1H -NMR-Spektrum (60 MHz) von 18 in DMSO_{d6} . Die unterschiedlichen chemischen Verschiebungen für die zwei Dimeren sind gekennzeichnet.

Das Spektrum zeigt, daß statt der erwarteten drei Signale im hohen Feld (2 für die N-CH_3 -Gruppen, 1 für das $\text{CH}(5)$ -Proton) genau sechs Signale auftreten. Diese haben auch je nach Reaktionsdauer, pH-Wert und Lösungsmittel andere Intensitäten zueinander. Es kann aber gezeigt werden, daß immer drei Signale zusammengehören und sich nur im Verhältnis zueinander ändern. Diese Signale entsprechen im relativen Intensitätsverhältnis jeweils genau dem $\text{CH}(5)$ -Proton und den beiden N-CH_3 -Gruppen in 3- und 10-Stellung. Auf Grund dieser Aussage wird klar, daß es sich bei dem gebildeten Dimeren um zwei Spezies handelt, die sich auch, je nach Reaktionsbedingungen, ineinander umlagern können.

Den beiden Verbindungen, die als Dimer I und Dimer II bezeichnet werden, werden folgende chemische Verbindungen zugeordnet:

in DMSO_{d6}

Dimer I	N-CH ₃ (3) = 2,90 ppm	Dimer II	N-CH ₃ (3) = 2,70 ppm
	N-CH ₃ (10) = 3,20 ppm		N-CH ₃ (10) = 3,30 ppm
	CH(5) = 4,20 ppm		CH(5) = 4,10 ppm
	Aromaten = 6,70-7,50 ppm		Aromaten = s.
	NH(1) = 10,70 ppm		NH(1) = Dimer I

2.4.2. Stereochemie des Dimeren

Die Stereochemie dieser beiden Dimeren gibt Aufschluß über die spektroskopischen Befunde.

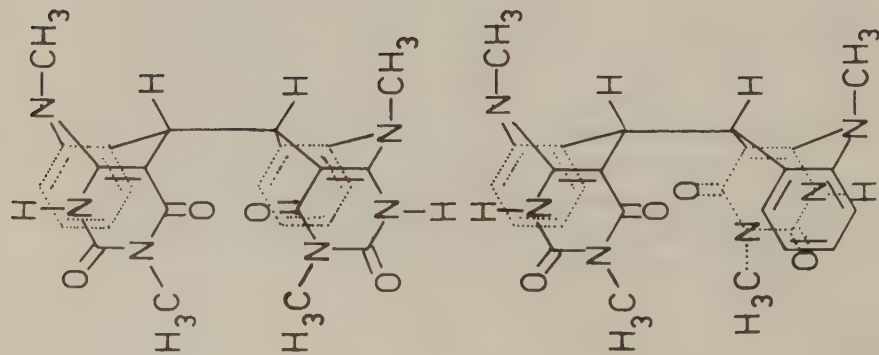
Das 5,5'-Bis-(1,5-dihydro)-5-deazaflavin 18 existiert im einfachsten Fall (d.h., wenn alle Boot-Inversionen, Rotationen und N(10)-Inversionen schnell im Sinne der NMR-Zeitskala sind) als:

a. 1 Meso-Form

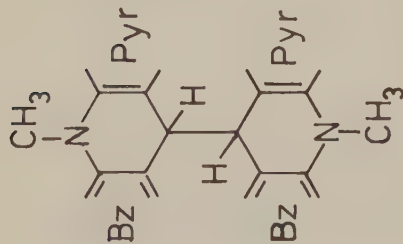
b. 1 Enantiomerenpaar (siehe Seite 54)

Andere konformere Formeldarstellungen ändern die prinzipielle Stereochemie nicht, d.h. erbringen bei erlaubten Konformationsänderungen keine zusätzlichen Isomeren. Es ergeben sich jedoch 2 Möglichkeiten der Illustration:

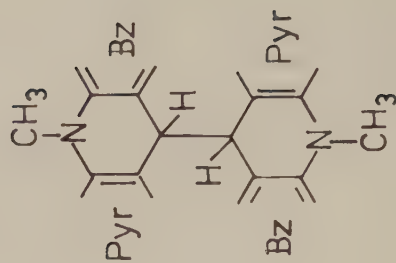
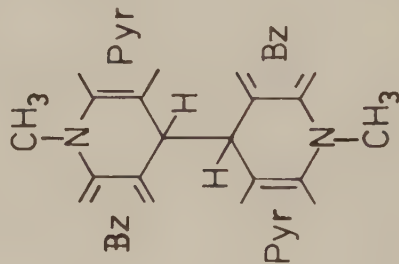
1. Entweder man läßt die 5,5'-Protonen immer cis (bisaxial = bisäquatorial) und erhält die Meso-Form durch gleichseitige Anordnung von Pyrimidin- bzw. Benzolring. Ein Enantiomer wird daraus durch Vertauschen einer Pyrimidin/Benzolringseite erhalten, daraus durch Spiegelung das entgegengesetzte Enantiomer.



≡



≡



Spiegelachse

Schema 6:

Diastereomere Formen des Dimeren 18

oben: 5(R), 5'(S) Meso-Form

unten: links: 5(S), 5'(S)

rechts

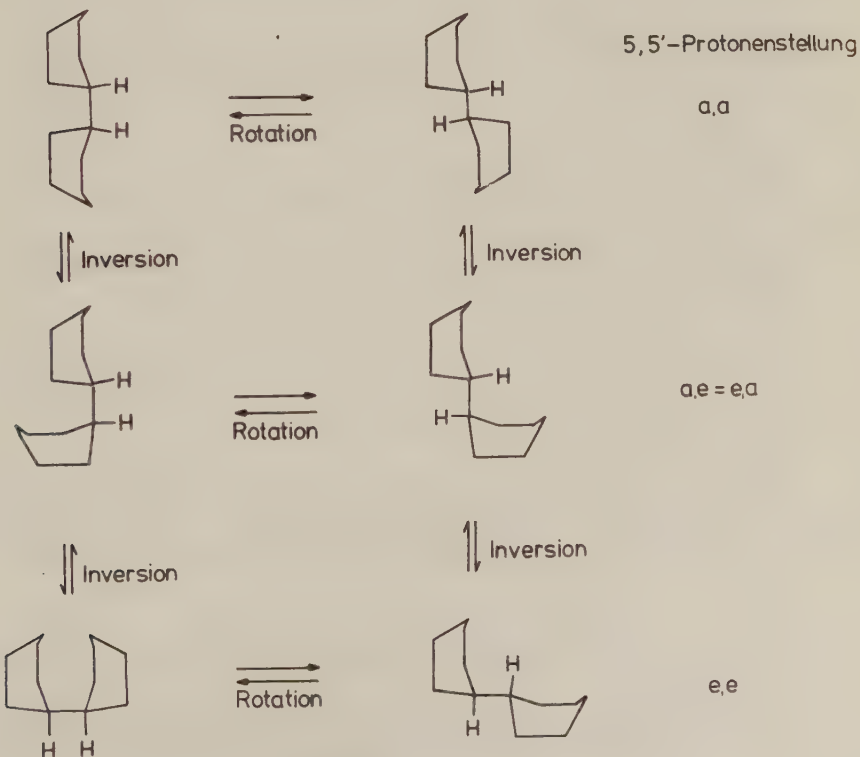
Enantiomere

d. Spiegelachse: 5(R), 5'(R)

2. Oder man läßt die Pyrimidin/Benzolringseiten immer gleich und erhält so die Meso-Form bei cis-ständigen 5,5'-Protonen. Ein Enantiomer wird daraus durch 5,5'-Verknüpfung bei trans-ständigen Protonen (a,e = e,a) erhalten, durch Spiegelung entsteht das Enantiomer entgegengesetzter Chiralität. Die Stereochemie ist in Schema 6 ausführlich beschrieben.

Einige Konformere des Dimers lassen sich durch die folgende Abbildung 8 darstellen:

Abbildung 8:



Durch Rotationen und Inversionen wird aber die prinzipielle Stereochemie des Dimeren nicht verändert. In dieser Darstellung ist jeweils nur der mittlere Dihydropyridinring in einer Cyclohexanwanne-Struktur stilisiert. Durch Hinzufügen der "Benzol- und Pyrimidinseiten" können dann die jeweiligen oben erwähnten Isomeren erhalten werden.

2.4.3. NMR-Diskussion

Aus dieser Darstellung der Stereoisomeren ergeben sich folgende Tatsachen, durch die auch die NMR-Spektren genau interpretiert werden können.

Man kann im NMR-Spektrum (siehe Seite 52) in allen benutzten Lösungsmitteln keine Kopplungskonstanten ($J_{5,5'} = 0$) feststellen.

Daraus folgen zwei Möglichkeiten:

- 1) Der Winkel zwischen den Bindungsachsen der Protonen in 5- und 5'-Stellung ist 90° .
- 2) Die Protonen in 5- und 5'-Stellung sind äquivalent, weswegen keine Kopplung gemessen wird.

zu 1) Diese Möglichkeit ist äußerst unwahrscheinlich, da 90° -Konformationen nur in Ausnahmefällen bevorzugt sind. Außerdem müßte dann die Kopplung temperatur- und lösungsmittelabhängig sein.

zu 2) $J = 0$ ist in zwei Fällen freier Rotation möglich:

- a) Wenn die Umgebung von 5 H und 5 H' identisch ist.
- b) Wenn die Umgebung von 5 H das Spiegelbild von 5 H' ist.

In diesen beiden Fällen sind die Protonen 5 H und 5 H' äquivalent, so daß keine Kopplung auftritt. Diese beiden Möglichkeiten a) und b) sind aber nun genau die beiden betrachteten stereochemischen Spezies Dimer I und Dimer II.

- a) Enantiomerenpaar (Räume um die Protonen 5 H = 5 H')

topologisch identisch, sie verhalten sich wie Bild und Bild.)

- b) Meso-Form (Räume um die Protonen 5 H und 5 H' verhalten sich wie Bild und Spiegelbild.)

Daraus folgt nun weiter, daß das NMR-Spektrum eine Äquilibrierung zwischen Enantiomerenpaar einerseits und Meso-Form andererseits nachweist. Die Frage bleibt nun, welche Signale (entweder Dimer I oder Dimer II) dem Enantiomerenpaar und welche der Meso-Form zuzuordnen sind. Diese Unterscheidung wird nur schwer, wenn überhaupt, möglich sein. Hinweise darauf könnte die Reaktionskinetik und der Mechanismus der Photoreaktion geben.

Neben dieser eindeutigen Interpretation der NMR-Daten ist für die N-CH₃ in 3-Stellung beider Spezies eine signifikante Hochfeldverschiebung gegenüber der elektronisch sehr ähnlichen 1.5-Dihydrospezies 9 zu beobachten (2.50 zu 3.15 ppm). Durch eine bestimmte sterische Fixierung im Dimer scheint gerade diese N-CH₃-Gruppe mit dem Aromaten in Wechselwirkung zu treten, woraus eine stärkere Abschirmung dieser CH₃-Gruppe resultiert und die Hochfeldverschiebung zustande kommt. Ähnliche Effekte sind bei der in der Dissertation von BAUCH⁵⁴⁾ besprochenen Spezies 31 zu beobachten. Verbindung 31 (Seite 86) unterscheidet sich von dem obigen Dimeren 18 nur durch die Substitution in 1 bzw. 1'-Stellung durch je eine Methylgruppe.

Ein von KNAPPE und ROTHFELDER⁹⁶⁾ untersuchtes Dimeres in der 1.5-Dideazaflavinreihe konnte ebenso in zwei Diastereomeren dargestellt werden, in denen auch die N-CH₃-Gruppe durch die Hochfeldverschiebung auffällt. (Darstellung s.S. 60)

2.4.4. Isolierung und Eigenschaften der Dimeren

Bei den Photoreduktionen von dFl_{ox} mit verschiedenen Substraten zeigt sich, daß bei längerer Bestrahlungszeit -- pH-Wert = 8 -- nur eine Form der Dimeren isoliert

werden kann, die in Abbildung 7 als Dimer II bezeichnet wurde. Durch Bestrahlung im NMR-Rohr kann gezeigt werden, daß die Signale von Dimer I auf Kosten der Neubildung der Signale von Dimer II verschwinden. Diese Photoumlagerung von I nach II beruht auf der homolytischen Spaltung der 5-5'-Bindung des Dimeren. Das kann durch zwei unabhängige Experimente bewiesen werden.

1. Durch Blitzlichtphotolyse des Dimeren entsteht ein Intermediär, welches kurzlebig ist und bei etwa 530 nm absorbiert¹⁰⁾ und anschließend wieder dimerisiert. Das gleiche Intermediär entsteht durch le^- -Reduktion in pulsradiolytischen Untersuchungen⁵⁶⁾, wodurch der Radikalcharakter annähernd bewiesen ist.
2. Die Spaltung kann auch durch dFl_{ox} Einbau in das Dimer nach Bestrahlung gezeigt werden, wenn die oxidierte Stufe gegenüber dem Dimer unterschiedlich substituiert ist¹⁰⁾. Die Substanz 8 (siehe Seite 19) ist durch den hydrophilen Substituenten $-(CH_2)_3-SO_3K$ wasserlöslich und ergibt bei Photoaustausch mit Dimer einen Einbau eines hydrophilen Anteils. Dadurch entsteht ein "gemischtes" Dimeres, welches dann wasserlöslich wird. Durch die folgende Gleichung wird dies deutlich:



Während mit Hilfe dieser Reaktionen Dimer II isoliert und danach spektroskopisch charakterisiert werden kann, gelingt die Dimer I durch eine ähnliche Austauschreaktion in starker Säure -- beim Stehenlassen eines Isomerengemisches unter anaeroben Bedingungen entsteht quantitativ Dimer I. Durch dFl_{ox}^+ katalysiert läuft diese Reaktion wahrscheinlich über eine polaren Mechanismus (siehe folgende Gleichung):

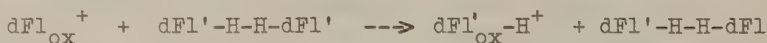
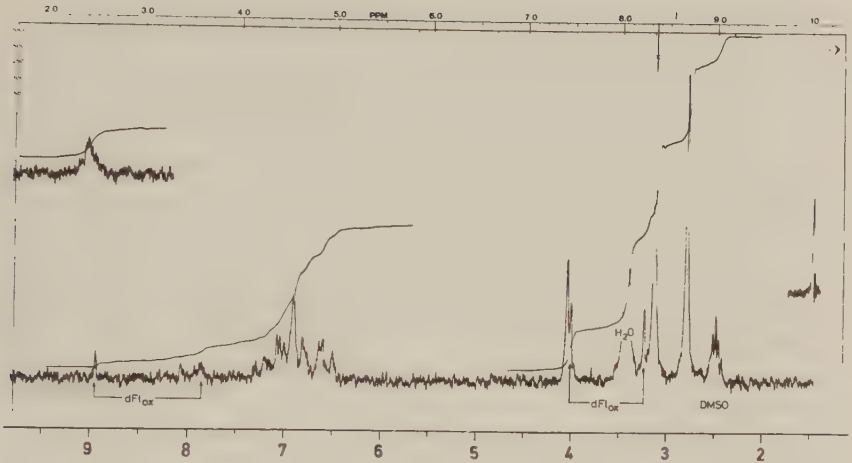
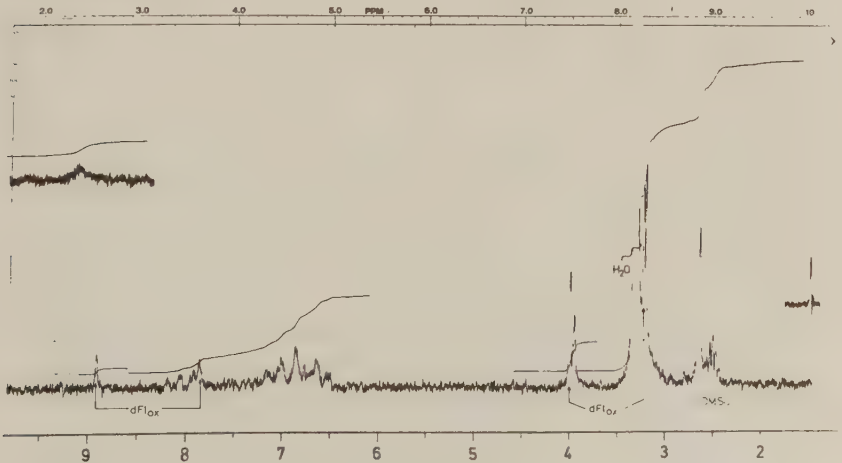


Abbildung 9:



^1H -NMR Spektrum (60 MHz) von 18 (Dimer I) in $\text{DMSO}_{\text{d}6}$.

Abbildung 10:



^1H -NMR Spektrum (60 MHz) von 18 (Dimer II) in $\text{DMSO}_{\text{d}6}$. Die Verunreinigungen von dFl_{ox} in Abb. 9 und 10 sind jeweils gekennzeichnet.

Von den beiden so isolierten Spezies konnten NMR-Spektren aufgenommen werden, die deutlich an Hand der Signale für die N-CH_3 Gruppen diese beschriebene Umwandlung zeigen. (Vergleich mit Dimerengemisch Abbildung 7, siehe Seite 52) In den anderen physikalischen und chemischen Eigenschaften erweisen sich die Dimeren als völlig gleich (siehe experimenteller Teil). Eine Enantiomerentrennung einer der beiden Spezies wurde wegen der Reoxidationsempfindlichkeit nicht untersucht.

Die Dimerbildung wird auch durch weitere spektroskopische Eigenschaften belegt. Im IR-Spektrum findet man weitgehend Analogie zum 1.5-Dihydroderivat 9, was durch die große Ähnlichkeit der Struktur auch zu erwarten war (siehe experimenteller Teil, Seite 132). Das Massenspektrum ähnelt der oxidierten Ausgangsverbindung dFl_{ox} 1, da durch die Ionisierung und thermische Zersetzung im Spektrometer die labile $\text{C}(5)\text{-C}(5')$ Bindung homolytisch gespalten wird und dadurch leicht dFl_{ox} mit $\text{ME} = 241$ entstehen kann. Der Molpeak des Dimer bei $\text{ME} = 484$ kann auch bei schonenden Anregungsarten wie Felddesorption nicht beobachtet werden. Die Molmasse mußte somit auf eine Art bestimmt werden; die dampfdruckosmetrische Bestimmung in DMF ergab mehrere Werte. So nahm im Verlauf der Messung die Molmasse des Dimeren von 450 über 350, 320 langsam auf 230 ab. Dies zeigt, daß die Verbindung zunächst als Dimer vorliegt, dann aber leicht durch Luftsauerstoff oxidiert werden kann und am Ende der Messung nur noch als dFl_{ox} bestimmt wird. Die Messungen sind mit einem Fehler von ca. $\pm 10\%$ behaftet.

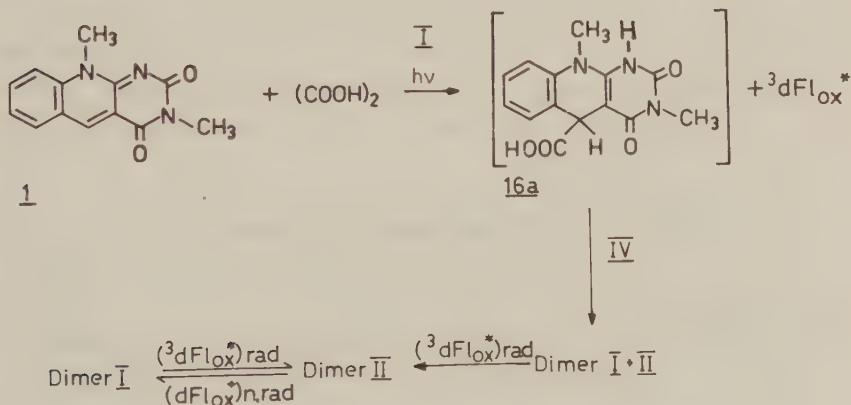
Neben der photochemischen Bildung des Dimeren kann die gleiche Verbindung auch auf elektrochemischem Weg dargestellt werden¹⁰⁾. Bei einer konstanten Spannung kann dFl_{ox} selektiv unter Aufnahme eines Redoxäquivalentes pro Deazaflavin in das Dimer überführt werden. Auf analogem Wege gelang es KNAPPE⁹⁷⁾, das 1.5-Dideazaflavin zum Dimeren zu reduzieren.

Auf die Reoxidationsreaktionen wird im Kapitel 3 gesondert eingegangen.

2.4.5. Mechanismus der Photoreaktion

Auf Grund der eben besprochenen Reaktionen des Dimers zeigt sich, daß zunächst eine bevorzugte Spezies dieses Dimers (Dimer I) aus dem Zwischenprodukt 16 und $^3\text{dFl}_{\text{ox}}^*$ entsteht (siehe NMR-Spektrum, Seite 52). Möglicherweise liegt hier ein sterisch bedingter energieärmerer Übergangszustand vor, aus dem heraus das kinetisch stabilste Produkt (Dimer I) gebildet wird. Durch weitere Bestrahlung von Dimer I entsteht daraus das photochemisch und thermodynamisch stabilste Produkt (Dimer II). Schema 7 verdeutlicht diese Aussagen:

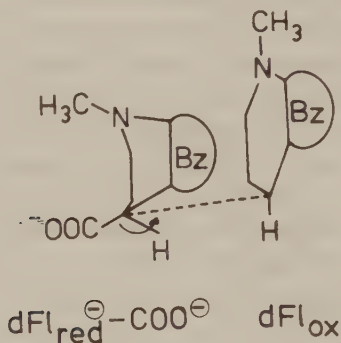
Schema 7:



(rad = radikalisch, n.rad = nicht radikalisch)

Auf Grund der weiter oben aufgeführten Tatsachen, sollte sich daraus der folgende Reaktionsmechanismus entwickeln lassen. Zunächst wird das Zwischenprodukt 16 in einer nucleophilen Addition an die 5-Position unter gleichzeitiger Decarboxylierung vom Substrat an das elektronendefiziente Deazaflavintriplett gebildet. Dieses Primäraddukt reagiert dann in einer "Photo $\text{S}_{\text{N}}2$ -Reaktion" mit einem

weiteren Molekül ${}^3\text{dFl}_{\text{ox}}^*$ zu einem Molekül-Substrat Komplex, der folgendermaßen aussehen sollte.



Dabei greift ${}^3\text{dFl}_{\text{ox}}^*$ auf der Rückseite zum austretenden CO_2 an. Es können die folgenden zwei Fälle unterschieden werden:

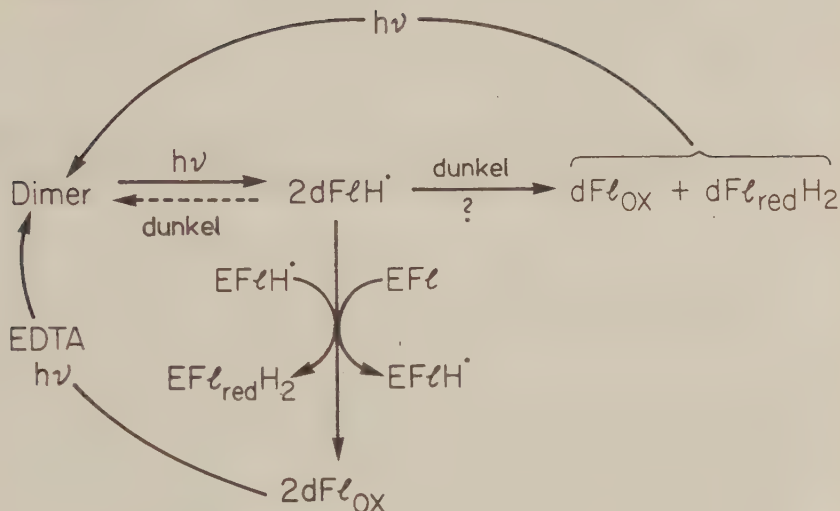
- 1) Im Übergangszustand kommen die Benzol- und Pyrimidinteilkerne aufeinander zu liegen, daraus folgt dann die Bildung der Meso-Form.
- 2) Im Übergangszustand liegt Benzol auf Pyrimidin und umgekehrt, es entsteht das Enantiomerenpaar.

Der Fall 2, also die Bildung des Enantiomerenpaares, sollte wahrscheinlicher sein, die Umentorierung und Weiterreaktion erfolgt dann unter Bildung des thermodynamisch und photochemisch stabileren Produktes, nach diesen Überlegungen der Meso-Form.

Wie KNAPPE¹⁰⁾ in blitzlichtphotolytischen Untersuchungen zeigen konnte, kann das Dimer in seine monomeren Radikale gespalten werden, die dann zu mindestens 95 % wieder dimerisieren. Daraus wird deutlich, daß die Umentorierung von Enantionenpaar in Meso-Form radikalisch verläuft, während die Bildung von Dimer I über einen ionischen Mechanismus zustande kommt.

Daß das Dimer in seine Monomeren photochemisch gespalten werden kann, wird auch durch Versuche von MASSEY⁹⁸⁾, die parallel zu dieser Arbeit durchgeführt wurden, deutlich.

Schema 8:



(E = enzymgebunden)

Er setzt Flavodoxin mit Dimer, hergestellt durch Bestrahlung von dFl_{ox} mit EDTA, in einer photochemischen Reaktion unter anaeroben Bedingungen um. Das im Dunkeln nicht reagierende Dimer 18 reduziert unter katalytischen Bedingungen bei Belichtung in zwei nacheinander folgenden Eielektronenschritten das Flavodoxin zunächst aus Semichinon und dann zum 1.5-Dihydroderivat. Daraus wird deutlich, daß das kurzlebige Radikal, die reaktive Spezies dieser Reaktion ist, wobei es selbst wieder zu dFl_{ox} 1 oxidiert wird. Durch das Schema 8 wird die katalytische Wirkung von Deazaflavin in Photoreaktionen mit Flavocoenzymen veranschaulicht.

Diese Reaktion bestätigt die Annahme einer homolytischen Spaltung des Dimers im Verlaufe der Photoreduktion mit allen wasserstoffübertragenden Substraten, bei denen die Dimerbildung den Endpunkt der Reaktion darstellt. Die Radikalbildung

ist damit nicht essentiell für die Reaktion zum Dimeren, wohl aber der Hintergrund für die Reaktivität des Dimeren in photochemischen Folgereaktionen.

2.4.6. Massenspektroskopische Charakterisierung von Zwischenprodukten bei der deazaflavinabhängigen Photoreduktion

Wie in Tabelle 9 gezeigt wird, konnten verschiedene Substrate zur Dimerbildung eingesetzt werden. Präparativ konnte aber auch mit den Substraten der Tabelle 10 das Dimer 18 als Endprodukt isoliert werden. In beiden Fällen wird laut allgemeinem Schema 2 (siehe Seite 40) eine Adduktstufe 16 durchlaufen, die jedoch NMR-spektroskopisch nicht charakterisiert werden konnte. Während man bei den Substraten der Tabelle 9 auch massenspektroskopisch keinen Peak für die Adduktstufe 16 auffinden konnte, gelang dies bei den Substraten der Tabelle 10. Es konnte in allen Fällen ein Molpeak beobachtet werden, dessen Intensität in der Größenordnung von 1 % lag.

Tabelle 10:

Massenspektroskopisch ermittelte Molmassen der photochemisch dargestellten 5-Deazaflavin Addukte.

Substrat	m/e (ME)	Intensität
Brenztraubensäure	285	1 %
Pivalinsäure	299	0.5 %
N,N-Dimethylglycin	300	1 %
Mandelsäure	349	1 %
O-Methylmandelsäure	363	1 %

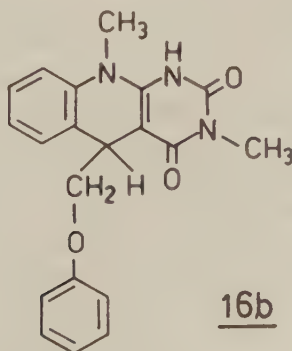
Damit ist auf einem anderen Weg die Adduktstufe 16 ebenfalls bewiesen, obwohl die Addukte NMR-spektroskopisch (Anteil des Adduktes am Gemisch mit dem Dimer unter 5 %) nicht charakterisiert werden konnten.

2.4.7. Isolierung und Eigenschaften von Deazaflavin-Substrat Addukten

Wie in Kapitel 2.3.2.2. gezeigt ist es möglich, Addukte von Substrat und Deazaflavin auf der reduzierten Stufe zu fassen. An zwei ausgewählten Beispielen soll die Strukturaufklärung gezeigt und die chemischen und physikalischen Eigenschaften erläutert werden.

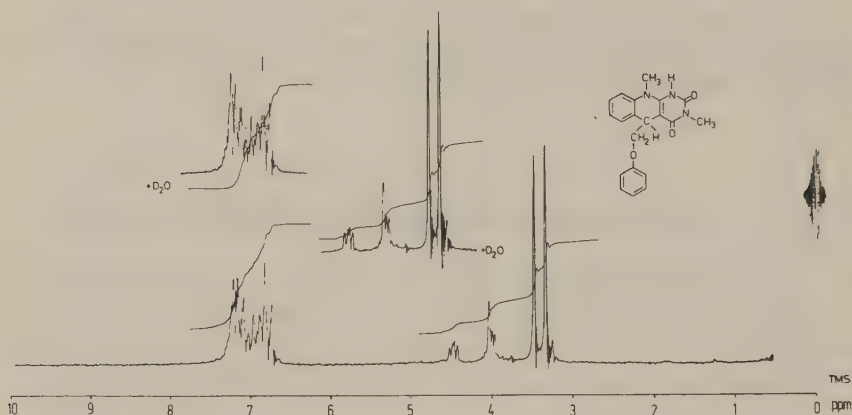
2.4.7.1. Reaktion von 5-Deazaflavin mit Phenoxyessigsäure

In einer anaeroben Photoreaktion (Photodecarboxylierung und Photodehydrierung) reagiert das Triplett des Deazaflavins mit Phenoxyessigsäure zu einem Addukt 16b, welches bei Durchführung der Reaktion in wässriger Lösung bei pH = 4 nach 65 h Bestrahlung als weißer Niederschlag anfällt. Durch Lösen der Substanz in wässriger Lösung bei pH = 10 und anschließender Zugabe von Essigsäure bis ca. pH = 4 kann eine chromatographisch einheitliche Verbindung erhalten werden. Wie die anschließende Diskussion zeigt, kann dieser Verbindung folgende Struktur zugeordnet werden.



2.4.7.2. NMR-Diskussion

Abbildung 11:



^1H -NMR Spektrum (100 MHz) von **16b**. Das mit D_2O austauschbare N-H Proton in 1-Stellung hat eine chemische Verschiebung von 10.90 ppm.

Abbildung 11 zeigt das 100 MHz ^1H -NMR Spektrum von **16b** in CDCl_3 . Für die N-CH₃ Gruppen in 3- und 10-Stellung, die Aromatenprotonen und das mit D_2O austauschbare N-H Proton in 1-Stellung sind ähnliche chemische Verschiebungen wie bei der reduzierten Verbindung **9** (siehe Seite 69) zu beobachten. Unterschiede machen allein das 5-H Proton und die 5 α -ständigen Methylenprotonen. Da die CH₂-Gruppe an einem asymmetrischen Zentrum sitzt, muß das Signal dieser Gruppe zu einem AB-System aufspalten. Dieser Aufspaltung ist die Kopplung mit dem CH (5) Proton überlagert, so daß daraus zwei komplizierte Systeme entstehen. Die Kopplungskonstanten dieser Multiplikts sind aus dem Spektrum nicht abzulesen.

Aus den Integrationen sind die Signale ($\delta = 4.00$ ppm für die CH_2 -Gruppe, $\delta = 4.50$ ppm für das CH-Proton) aber eindeutig zuzuordnen und weisen auf die obige Struktur hin. Entkopplungsexperimente ergaben auf Grund der sehr ähnlichen chemischen Verschiebungen der beiden Multipletts keine eindeutigen Ergebnisse.

2.4.7.3. Eigenschaften vom Phenoxyessigsäure-Addukt

Die anderen spektroskopischen Daten belegen ebenso die oben genannte Struktur.

Im Massenspektrum ist der Molpeak bei 349 ME schwach zu erkennen, da die 5-5'-Bindung vom Grundgerüst zum Phenoxy-methylrest ($\text{ME} = 107$) im Massenspektrometer leicht spaltbar ist, was durch die Fragmentierung zum Peak bei 242 ME deutlich wird. Danach ist eine dem Grundgerüst ähnliche Fragmentierung zu beobachten (siehe exp. Teil).

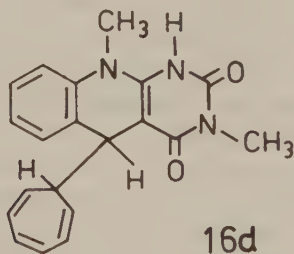
Im IR-Spektrum ist neben den auffallenden Carbonylbanden (bei 1705 und 1630 cm^{-1}) eine Bande bei 1210 cm^{-1} zu beobachten; die Absorption ist der C-O Einfachbindung zuzuordnen.

Die Elektronenspektren zeigen deutlich den Chromophor eines Dihydrodeazaflavins mit einem Maximum bei 306 nm ($\epsilon = 12500$) in Acetonitril. Der pK-Wert des N-H Protons in 1-Stellung wurde spektrophotometrisch und potentiometrisch übereinstimmend zu 8.0 ± 0.1 bestimmt.

Das Addukt 16b ist gegen Oxidation sehr stabil (O_2/hv). Erst durch stärkere Oxidationsmittel, wie Nitrit in Eisessig, kann 16b in dFl_{ox} 1 zurückgeführt werden.

2.4.7.4. Reaktion von 5-Deazaflavin mit Cycloheptatrien

Wie unter 2.3.3.1 für die Reaktion in Acetonitril als aprotisches Lösungsmittel gezeigt wurde, reagieren Cycloolefine nach dem angegebenen Reaktionsschema 5 (s.S.47). In einer anaeroben Photoreaktion reagiert Deazaflavin mit Cycloheptatrien zu einem Addukt, welches in Acetonitril löslich ist. Nach einer Bestrahlungsdauer von 30 min kann eine weiße kristalline Substanz durch Eindampfen von Acetonitril und wieder Ausfällen mit Äther erhalten werden. Dieser Substanz kann mit Hilfe spektroskopischer Methoden folgende Struktur zugeordnet werden:



2.4.7.5. NMR-Diskussion

Abbildung 12 zeigt das 100 MHz ^1H -NMR Spektrum von 16d in DMSO-d_6 , zum Vergleich wurde außerdem $\text{dFl}_{\text{red}}\text{H}_2$ 9 und Cycloheptatrien im gleichen Lösungsmittel aufgenommen und die chemischen Verschiebungen mit eingezeichnet. Durch diesen Vergleich und mit Doppelresonanz und Spinentkopplung konnte die Struktur zweifelsfrei bestimmt werden.

Das NMR-Spektrum von 16d zeigt für die N-CH_3 Gruppen in 3- und 10-Stellung ($\delta \text{N-CH}_3(3) = 3.18 \text{ ppm}$, $\delta \text{N-CH}_3(10) = 3.34 \text{ ppm}$) sowie für die Aromatensignale ($\delta \text{Arom.} = 7.00\text{--}7.35 \text{ ppm}$)

und das N-H(1) Proton ($\delta = 11.04$ ppm) ähnliche chemische Verschiebungen wie dFl_{red}H₂ 2. Unterschiedlich ist das Signal der CH(5) Protonen. Während bei 2 ein Singulett (Intensität = 2) bei $\delta = 3.65$ ppm zu erkennen ist, zeigt 16d aufgrund der Nachbarschaft des 5 α Protons des Cycloheptatrienylrestes ein Duplett (Intensität = 1) bei $\delta = 4.40$ ppm. Die Kopplung von 8 Hz muß beim CH(5 α) Proton (Proton a in der Abbildung) wiederzufinden sein, wird aber durch die Kopplung des Protons a mit den Protonen b überdeckt. Mit Hilfe von Doppelresonanzexperimenten wird hier Aufschluß erhalten. Wird an der Stelle des Protons a mit einer externen Radiofrequenz eingestrahlt, so wird die Kopplung von CH(5) und CH(5 α) aufgehoben. Das Signal des Protons in 5-Stellung zeigt dann ein Singulett. Wird auf der anderen Seite beim Proton CH(5) und den Protonen b des Cycloheptatrienylrestes eingestrahlt, so vereinfacht sich das Multiplett bei $\delta = 1.44$ für CH(5 α) und fällt zu einem Singulett zusammen. Damit ist eindeutig die Nachbarschaft von CH(5) und Cycloheptatrienylrest, und damit die Fixierung des Restes in 5-Stellung vom Deazaflavin bewiesen. Interessant ist weiterhin die starke Verschiebung des Protons a im Cycloheptatrienylrest im Verhältnis zu den CH₂ Protonen a im unsubstituierten Cycloheptatrien. Während sich die Protonen b,c,d des Tropolidenrestes in den beiden Spektren kaum unterscheiden, verschiebt sich das Signal für a um ca. 0.8 ppm zu hohem Feld. Damit ist gezeigt, daß bei Substitution die Abschirmung der Protonen wächst und die Verschiebung nach hohem Feld hervorruft.

2.4.7.6. Weitere spektroskopische und chemische Eigenschaften vom Cycloheptatrienyl-Addukt

Neben dem Beweis durch NMR-Spektroskopie zeigen auch die anderen spektroskopischen Daten genaue Übereinstimmung mit der o.a. Struktur.

Im Massenspektrum ist der Molpeak M^+ bei 333 ME schwach aber deutlich (2%) zu erkennen, nach Abspaltung des Cycloheptatrienylrestes wird eine dem Deazaflavin ähnliche Fragmentierung beobachtet. (Näheres s. exp. Teil) Das IR-Spektrum zeigt bei kleinen Wellenzahlen neben einer Absorption für aromatische CH-Bindungen (out of plane) bei 750 cm^{-1} auch eine weitere, bei vergleichbaren Substanzen fehlende Absorption bei 700 cm^{-1} , die den Schwingungen der olefinischen CH-Bindungen (out of plane) zugeordnet werden muß.

Das Elektronenspektrum zeigt deutlich den Chromophor eines Dihydrodeazaflavins mit einem Maximum bei 306 nm ($\epsilon = 13000$). Durch Vergleich mit anderen Addukten (s. S. 67) und $dFl_{red}H_2$ 9 wird ersichtlich, daß alle Maxima von Addukten hypsochrom gegenüber $dFl_{red}H_2$ 9 verschoben sind. Es folgt daraus, daß die Addukte an dieser Verschiebung zu kleineren Wellenlängen leicht zu erkennen sind. Die molaren Extinktionen der reduzierten Spezies unterscheiden sich nur wenig.

Ebenso wie das Phenoxymethyl-Addukt 16b erweist sich 16d als sehr stabil. Thermisch und durch Reoxidation mit $O_2/h\nu$ kann es nur unvollständig in dFl_{ox} 1 zurückgeführt werden.

2.5. Mechanismus der deazaflavinabhängigen Photoreaktion

Im allgemeinen Schema 2 auf Seite 40 sind die möglichen Reaktionswege bei Photoreduktionen von 5-Deazaflavinen aufgeführt. Dabei sind folgende Reaktionsmöglichkeiten zu unterscheiden:

- über Weg I: Bildung eines stabilen Adduktes 16;
- über Weg I, II u. V oder Weg I u. IV: Bildung eines Dimeren 18;
- über Weg I u. III: Bildung eines Dimeren 18a.

Die spektroskopische Untersuchung der Endprodukte hat gezeigt, daß die Bildung von Addukten 16 und Dimeren 18 verifiziert ist.

Für den Mechanismus ergeben sich daraus folgende Fragen:

- 1) Über welche Zwischenstufen wird Dimer 18 gebildet?
- 2) Ist $dFl_{red}H_2$ 9 ein Substrat in Photoreduktionen von dFl_{ox} 1?
- 3) Welcher Bindungsbruch ist der geschwindigkeitsbestimmende Schritt, d.h. treten Isotopeneffekte bei Photoreaktionen mit deuterierten Deazaflavinen auf?
- 4) Komproportionieren andere Addukte des Typs 16, die nicht auf photochemischem Wege dargestellt wurden, immer zu Dimer 18 oder auch zu Dimer 18a?

Mit Hilfe der Beantwortung dieser Fragen sollte ein allgemeiner Mechanismus für deazaflavinabhängige Photoreduktionen formuliert werden können.

2.5.1. Photokomproportionierungsreaktionen

Die Dimerbildung wird auf Seite 40 als eine Reaktion beschrieben, die im wesentlichen aus 2 Teilreaktionen besteht.

- 1) Kovalente Photoaddition des Substratrestes an das Deazaflavintriplett;
- 2) Schnelle sekundäre Photoreaktion dieses Adduktes mit weiterem Deazaflavin unter Bildung eines Dimers, wobei der oxidierte Substratrest freigesetzt wird.

Die zweite dieser Teilreaktionen ist dadurch leicht zu beweisen, wenn Deazaflavin-Addukte vom Typ 16 als Substrate in Photoreaktionen mit oxidiertem 5-Deazaflavin eingesetzt werden. Durch die "Kreuzung" dieser beiden Oxidationsstufen müßte in einer Photoreaktion die stabile Form der Semichinonstufe, das Dimere entstehen (s.Tab. 11).

Neben Addukten vom Typ 16 wird auch die unsubstituierte reduzierte Spezies $dFl_{red}H_2$ 9 auf Photokomproportionierung mit dFl_{ox} 1 untersucht, um zu zeigen, ob Weg V neben Weg IV (s.S. 40) experimentell verifiziert werden kann.

Tabelle 11:

Photokomproportionierungsreaktionen vom Typ $^3\text{dFl}_{\text{ox}}^* + \text{dFl}_{\text{red}}^{\text{H-5-R}}$

Substrat		in CH_3CN	in $\text{H}_2\text{O}/\text{pH} = 9$
$\text{dFl}_{\text{red}}^{\text{H}_2}$	<u>9</u>	1800	1800
$\text{dFl}_{\text{red}}^{\text{D}_2}$	<u>26</u>	900	-
$\text{dFl}_{\text{red}}^{\text{H-5-COOH}}$	<u>12</u> (<u>16a</u>)	3600	-
$\text{dFl}_{\text{red}}^{\text{H-5-COOCH}_3}$	<u>13</u>	1100	-
$\text{dFl}_{\text{red}}^{\text{H-5-CH}_2\text{-O-C}_6\text{H}_5}$	<u>16b</u>	1	-
$\text{dFl}_{\text{red}}^{\text{H-5-C}_7\text{H}_7}$	<u>16d</u>	1	-
$\text{dFl}_{\text{red}}^{\text{H-5-CN}}$	<u>35</u>	480	-
$\text{dFl}_{\text{red}}^{\text{H-5-CH}_2\text{-CO-CH}_3}$	<u>40</u>	360	-
$\text{dFl}_{\text{red}}^{\text{H-5-CH}_3}^*)$	<u>42</u>	75	-
5.10-Dihydro-1.3-dimethyl-5-deaza-alloxazin	<u>20</u>	2400	-
5.10-Dihydro-1.3.10-trimethyl-5-deaza-alloxazin	<u>21</u>	1600	-

Reaktionsbedingungen:

K_1 -Filter, anaerob/Argon

$(\text{dFl}_{\text{ox}}) = 5 \cdot 10^{-5} \text{ Mol/l}$

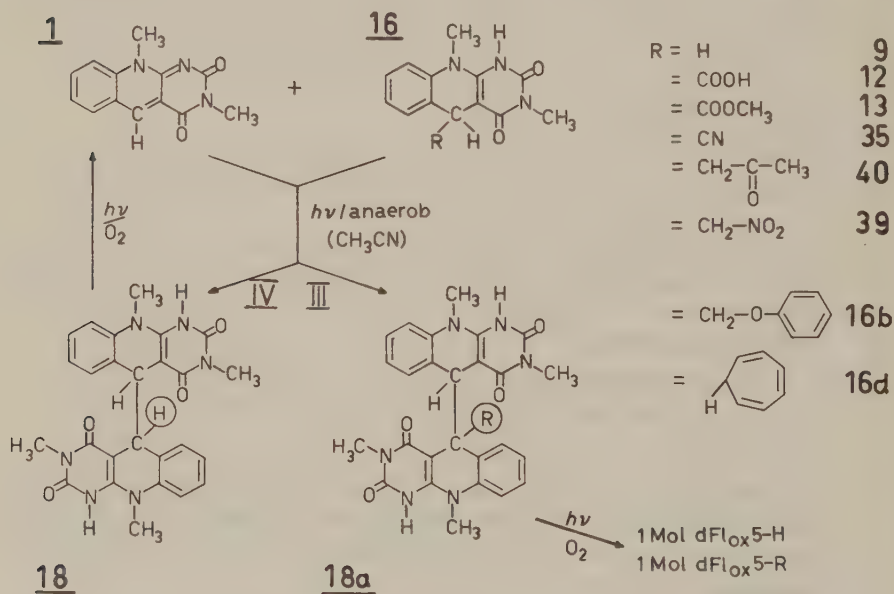
$(\text{dFl}_{\text{red}}^{\text{HR}}) = 5 \cdot 10^{-5} \text{ Mol/l}$.

Die Halbwertszeit 1 ist für die Reaktion mit 16d gewählt. Die Konzentration an dFl_{ox} hat bei dieser Reaktion innerhalb von 2 h etwa um die Hälfte abgenommen.

*) Für die Überlassung dieser Substanz möchte ich mich an dieser Stelle bei M. JANDA, Universität Konstanz bedanken. Die Darstellung erfolgte durch Grignard-Reaktion mit $\text{dFl}_{\text{ox}} \underline{1}$ und anschließender Hydrolyse ⁹⁹⁾.

Aus Tabelle 11 wird deutlich, warum bei den Reaktionen mit Phenoxxyessigsäure in Wasser und Tropiliden in Acetonitril die Addukte als Endprodukte isoliert werden können, denn bei den Kreuzungsreaktionen dieser Addukte mit dFl_{ox} 1 findet nahezu keine Dimerbildung statt. Reaktionsschema 9 zeigt noch einmal, daß bei diesen Komproportionierungsreaktionen prinzipiell zwei Endprodukte 18 oder 18a über die Wege III und IV auftreten können.

Schema 9:



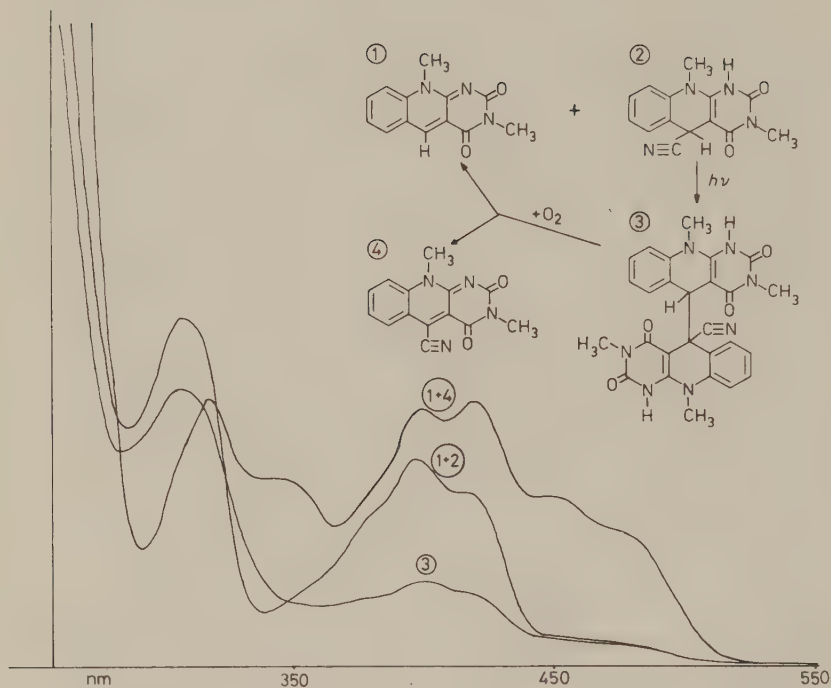
Zunächst ist es möglich, daß der Rest R unter Zurücklassung des Elektronenpaares als Kation abgespalten wird, welches sich seinerseits z.B. durch Abspaltung eines Protons stabilisieren kann. Dabei bildet sich als Endprodukt das

5-H,5'-H Dimere 18, so wie es schon auf Seite 40 gezeigt wurde (Weg IV). Wenn die Abspaltung des Restes R allerdings energetisch ungünstig ist, so ist auch ein anderer Verlauf denkbar. Bei Abspaltung eines Protons würde sich dann im Gegensatz zur ersten Möglichkeit ein 5-H,5'-R Dimeres 18a bilden können. Wenn dabei R nicht zu voluminös ist, dann wäre ein solcher Reaktionsverlauf nicht auszuschließen.

Abbildung 13 zeigt die Photoreaktion des durch Dunkelreaktion erhaltenen Cyanid-Adduktes 35 (Bildung dieses Adduktes siehe Seite 98) mit dFl_{ox} 1. Hierbei treffen die eben gemachten Annahmen zu, der Cyanid Rest ist nicht als Kation abspaltbar und stellt sterisch keine zu hohen Anforderungen, es müßte also ein 5-H,5'-R Dimeres 18a gebildet werden können.

In Abbildung 13 stellt die mit 1+2 bezeichnete Kurve eine im Dunkeln bereitete Mischung von dFl_{ox} 1 und dFl_{red} H-5-CN 35 (gleiche molare Mengen) dar. Wird eine solche Mischung unter anaeroben Bedingungen bestrahlt, dann verschwindet der Chromophor von dFl_{ox} und es tritt, dargestellt durch die Kurve 3, Dimerbildung ein. Aus dem bisherigen Verlauf kann man allerdings das 5-H,5'-H 18 und das 5-H,5'-R Dimer 18a noch nicht unterscheiden, denn beide absorbieren etwa im Bereich von 310 nm. Durch Reoxidation des Dimeren kann diese Unterscheidung getroffen werden, denn bei aerober Bestrahlung wird das Dimer wieder in die oxidierte Stufe zurückgeführt (siehe Seite 94). Die Kurve, die mit 1+4 gekennzeichnet ist, zeigt diese Reoxidation. Aus ihr wird deutlich, daß neben der Bildung von dFl_{ox} (langwelliges Absorptionsmaximum bei ca. 400 nm in Acetonitril) ein weiterer Chromophor entsteht, der bei ca. 450 nm sein langwelliges Maximum besitzt. Dabei handelt es sich, wie weiter unten gezeigt wird, um ein 5-substituiertes oxidiertes 5-Deazaflavin dFl_{ox} 5-CN 37.

Abbildung 13:



Photochemische Reaktion von dFlox 1 (10^{-4} M) mit dFRedH-5-CN 35 (10^{-4} M) in Acetonitril unter Sauerstoff-Ausschluß in einer 1 cm Thunberg-Küvette und anschließende Reoxidation.

Bestrahlungsdauer: Kurve 1+2 = 0 sec, Kurve 3 = 45 sec, Kurve 1+4 + $O_2/h\nu$ = 40 sec.

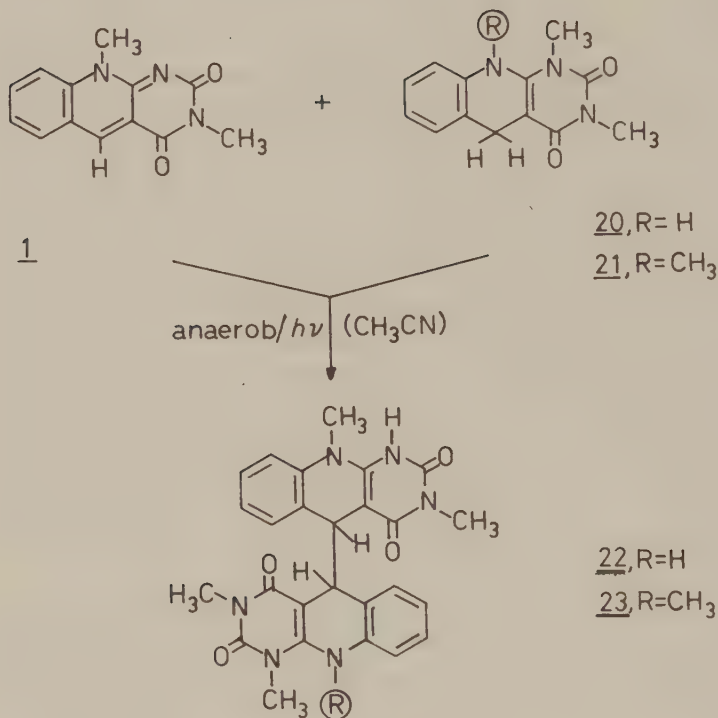
Durch dünnschichtchromatischen Vergleich konnte die Identität dieser zwei Produkte aufgezeigt werden. Damit ist die Bildung eines 5-H,5'-R Dimeren 18a bewiesen.

"Gekreuzte" Dimeren könnten auch bei anderen substituierten Deazaflavinen erhalten werden, z.B. beim 5-Acetyl Addukt 40 und der 5-Methyl Verbindung 42. Da sich aber

dFl_{ox} 1 und die substituierten Deazaflavine dFl_{ox}-5-CH₂-CO-CH₃ 41 und dFl_{ox}-5-CH₃ 43 in den Elektronenspektren nur unwesentlich unterscheiden, wurde bei diesen Reaktionen mit Hilfe der Dünnschichtchromatographie die Bildung von zwei Produkten nach der Reoxidation des Dimeren gezeigt und damit die Bildung des 5-H,5'-R Dimeren 18a als Zwischenstufe. Dieses Dimer 18a tritt allerdings in keinem Fall bei Photoreduktionen von ³dFl_{ox}* mit den untersuchten Carbonsäuren, Alkoholen und ungesättigten Kohlenwasserstoffen auf, spielt also im Mechanismus der Dehydrierung dieser Substrate keine Rolle. Bei diesen Reaktionen entsteht immer, wenn das Addukt 16 nicht stabil ist, das Dimer 18, die Frage bleibt nur über welchen Weg, da dFl_{redH2} 9 mit dFl_{ox} 1 (siehe Tabelle 11) in einer schnellen Photoreaktion das Dimer 18 bilden kann. Die Aufklärung über die verschiedenen Wege (siehe Seite 81) ist im Kapitel 2.5.2.2. aufgezeigt. Der Mechanismus der Dimerbildung ist aber in jedem Fall nicht radikalisch, da Radikale als Intermediäre bei Photoreduktionen nicht beobachtet werden konnten (siehe S. 61).

Neben den "gekreuzten" Dimeren vom Typ 18a können auch in anderen Reaktionen unsymmetrische Dimere erhalten werden, nämlich bei der photochemischen Umsetzung von dFl_{ox} 1 mit Dihydro-5-deaza-alloxazinen^{14,54}). Dabei unterscheiden sich die beiden Hälften der Dimeren einmal durch die Substitution in 1-Stellung, zum anderen durch die Substitution in 10-Stellung, was durch Schema 10 deutlich wird. Die reduzierten Dezaalloxazine besitzen ebenso wie die reduzierten Dezaaisalloxazine eine aktive Methylengruppe in 5-Stellung, aus der leicht ein Proton unter anschließender Dimerbildung abgespalten werden kann, was der Reaktionsverlauf zeigt.

Schema 10:



2.5.2. Isotopeneffekte bei deazaflavin-abhängigen Photoreaktionen

Aus Tabelle 11 wird deutlich, daß auch dFl_{red}H₂ 9 mit dFl_{ox} 1 die eben beschriebenen Photokomproportionierung unter Dimerbildung mit hoher Umsatzgeschwindigkeit eingeht. Da die Dimerbildung nach einem ionischen Mechanismus abläuft, sollte die Abspaltung eines Protons (der Bruch einer C-H Bindung) der reduzierten Spezies die

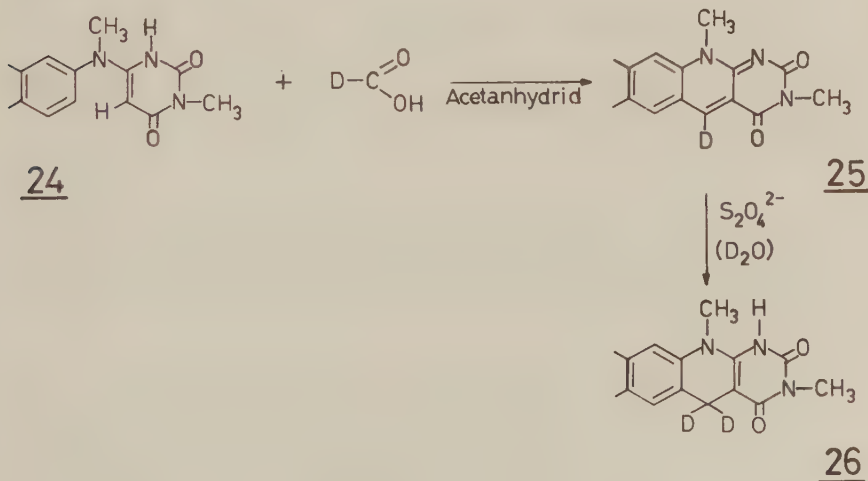
Geschwindigkeit der Reaktion bestimmen. Mit in 5-Stellung deuterierten Verbindungen sollte diese Frage (Frage 3 Seite 72) geklärt werden können.

Da es sich bei den deuterierten Verbindungen um in der Literatur noch nicht bekannte Substanzen handelt, soll die Synthese hier kurz beschrieben werden¹⁰⁾.

2.5.2.1. Synthese der deuterierten Verbindungen

Auf Seite 18 wurde bereits die Darstellung von Deazaflavinen nach JANDA und HEMMERICH²¹⁾ bzw. YONEDA et al.⁵²⁾ beschreiben, in einer Abwandlung gelang es JANDA*) durch Kondensation des entsprechenden N-Methyl-anilinouracils 24 mit Deuteroameisensäure in Acetanhydrid das 5-Deuterio-5-deazaflavin 25 in guter Ausbeute darzustellen¹⁰⁾.

Schema 11:



*) Ich möchte mich an dieser Stelle bei Michael JANDA (Universität Konstanz) für die Überlassung der Substanz dFl_{ox}5-D 25 herzlich bedanken.

Durch Reduktion von 25 mit Dithionit in D₂O kann mit 90 %iger Ausbeute die 5.5-dideuterierte Verbindung 26 dargestellt werden¹⁰⁾.

2.5.2.2. Photoreaktionen der deuterierten Spezies

Die beschriebenen Komproportionierungsreaktionen werden auf die deuterierten Verbindungen übertragen. Tabelle 12 zeigt die unterschiedlichen Reaktionsmöglichkeiten für Komproportionierungen, und jeweils den Vergleich zu den Reaktionen der nicht deuterierten Spezies.

Tabelle 12:

	CH ₃ CN	H ₂ O/pH=9
1) dFl _{ox} -5-H + dFl _{red} D ₂ / dFl _{ox} -5-H + dFl _{red} H ₂	1.80	1.60
2) dFl _{ox} -5-D + dFl _{red} H ₂ / dFl _{ox} -5-H + dFl _{red} H ₂	1.10	1.05
3) dFl _{ox} -5-D + dFl _{red} D ₂ / dFl _{ox} -5-H + dFl _{red} H ₂	1.90	1.70

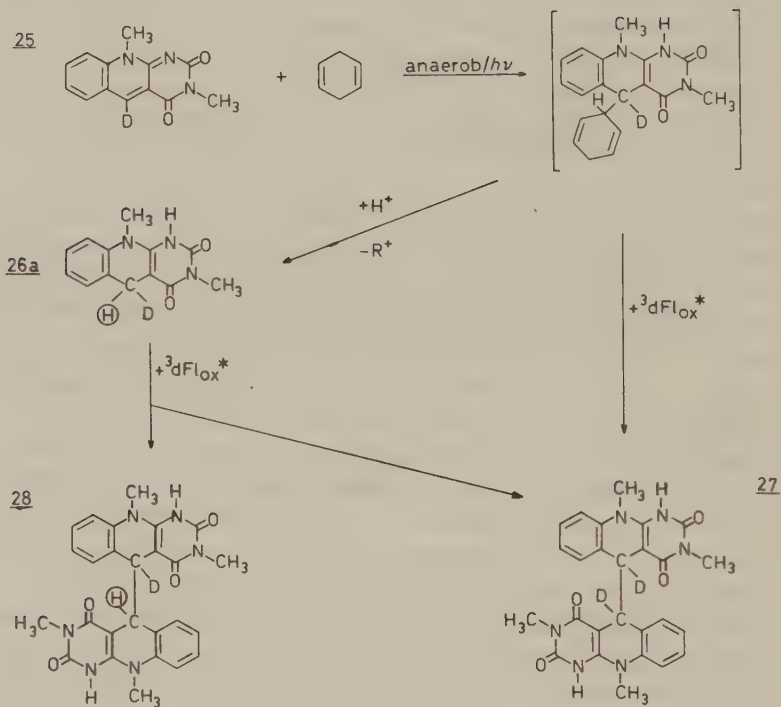
dFl_{ox} und dFl_{red}H₂ (10⁻⁴ M) werden unter anaeroben Bedingungen im Dunkeln gemischt und dann bestrahlt. Die relativen Extinktionsabnahmen bei 390 nm werden für die protischen und deuterierten Verbindungen bestimmt und miteinander verglichen. Der Fehler des Isotopeneffektes ist etwa ± 0.1.

Diese Ergebnisse lassen folgende Interpretationsmöglichkeiten zu: Der nucleophile Partner dFl_{red}H₂ bestimmt aufgrund des Bindungsbruchs C-H bzw. C-D bei der Addition an die elektronenarme 5-Position des oxidierten Deazaflavins die Geschwindigkeit der Photoreaktion. Sowohl im protischen als auch im aprotischen Medium ist bei der Reaktion 1)

ein deutlicher Isotopeneffekt zu beobachten. Wird hingegen statt $dFl_{ox}-5H$ die 5-deuterierte Spezies eingesetzt, zeigt sich nahezu keine Verlangsamung der Reaktion. Dieses Ergebnis stimmt mit der oben gemachten Arbeitshypothese überein, da bei der oxidierten Spezies keine C-H Bindung während der Reaktion gebrochen wird. Bei der Reaktion 3) tritt der Isotopeneffekt in der gleichen Größenordnung wie in Reaktion 1) wieder auf, da auch hier der nucleophile Partner deuteriert ist.

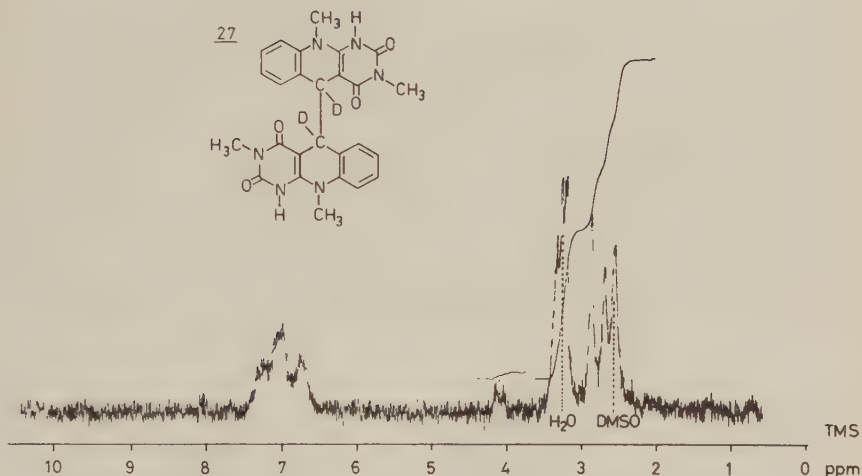
Mit den Experimenten dieses Abschnitts sind die Fragen 2,3 und 4 auf Seite 72 geklärt, die Beantwortung der Frage 1 ist mit Hilfe der deuterierten Verbindung $dFl_{ox}-5-D$ 25 möglich. Dazu werden verschiedene Substrate mit 25 photochemisch umgesetzt. Schema 12 zeigt eine solche Photoreaktion am Beispiel des 1.4-Cyclohexadiens. Läuft die Reaktion über die Adduktstufe direkt zum Dimeren, entsteht ein 5-D,5'-D Dimeres 27, wird nach der photochemischen Addition die reduzierte Spezies 26a, z.B. thermisch, gebildet, dann müßte bei der nachfolgenden Komproportionierung ein Gemisch aus gleichen Teilen 5-D,5'-D Dimeren 27 und 5-D,5'-H Dimeren 28 entstehen, solange der Isotopeneffekt 1 ist. Es könnte also in einem NMR-Spektrum maximal 25 % Verlust des Deuteriums in 5- bzw. 5'-Stellung auftreten; der Verlust wird durch den Isotopeneffekt von ca. 2 auf etwa 15 % vermindert.

Schema 12:



Das NMR-Spektrum dieses Photoproduktes zeigt etwa 12 % H in 5- bzw. 5'-Stellung (Abbildung 14). Sonst ist das Spektrum mit dem der Verbindung **18** identisch. Das intermediäre Addukt ist also bei dieser Reaktion instabil und zerfällt zu einem Teil zu $dFl_{red}H_2$. Die Labilität der Addukte in Photoreaktionen mit Cyclohexadienen wird auch in der Flavinreihe beobachtet⁹⁵⁾.

Abbildung 14:

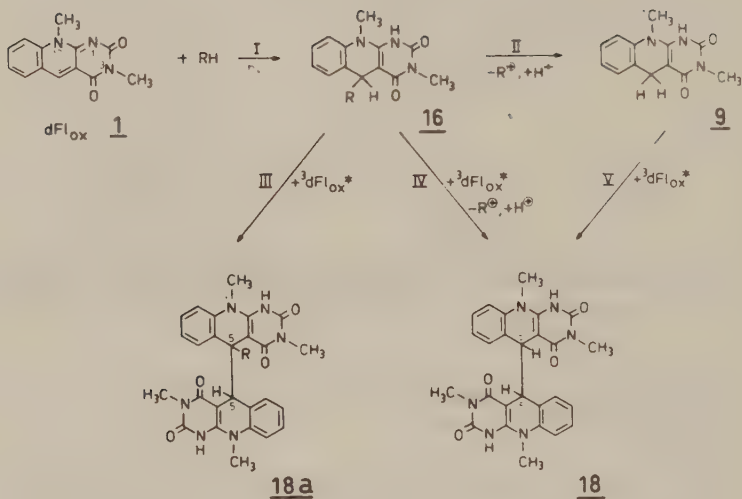


^1H -NMR-Spektrum (100 MHz) von 27 in DMSO-d_6 . Bei ca. 4.00 ppm treten etwa 12 % H auf.

Die Photoreaktionen mit anderen Substraten, Benzylalkohol bei pH = 11 und Mandelsäure bei pH = 8 jeweils in D_2O , liefern andere Ergebnisse. Hier kann gezeigt werden, daß $\text{dFl}_{\text{red}}\text{H}_2$ kein Intermediär ist, da bei beiden Reaktionen kein Verlust an Deuterium in 5- bzw. 5'-Stellung beobachtet wird. Das schließt jeglichen Wasserstoff-Transfer von Substrat zu Deazaflavin aus. Dieses Experiment zeigt, daß bei Photoreaktionen in der 5-Deazaflavinreihe die Gruppenübertragung und nicht die Wasserstoffübertragung bevorzugt wird. Gleichzeitig ist es auch ein Hinweis, daß Photoreaktionen in der Flavinreihe nach einem ähnlichen Mechanismus ablaufen, Primäraddukte werden hierbei leicht solvolytisch gespalten.

Aufgrund aller Experimente kann somit ein allgemeiner Mechanismus (Schema 13) formuliert werden. Schema 13 führt Schema 2 auf Seite 40 weiter aus und zeigt dabei 4 unterschiedliche Reaktionsfolgen auf.

Schema 13:



Reaktionsfolge I : $\text{RH} = \text{C}_6\text{H}_6, \text{PhCH}_2\text{CO}_2\text{H}, \text{PhOCH}_2\text{CO}_2\text{H} (-\text{CO}_2)$

I, IV : $(\text{CO}_2\text{H})_2, \text{Ph}-\underset{\text{OH}}{\text{CH}}-\text{CO}_2\text{H}, \text{EDTA}$

I, II, V : C_6H_6

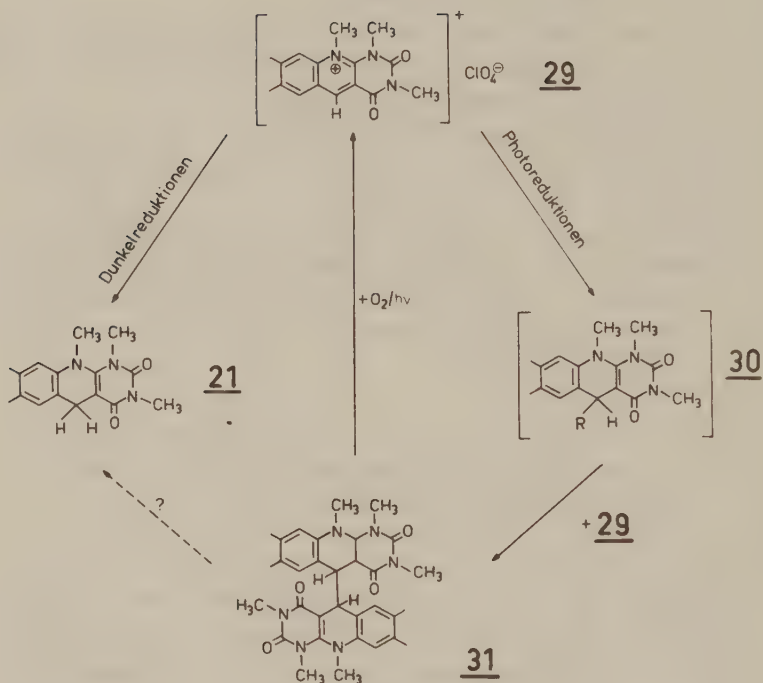
III : $\text{R} = \text{CN}$

- 1) Stabile Addukte werden bei Cycloheptatrien, Phenyl- und Phenoxyessigsäure gefunden.
- 2) Die meisten Addukte vom Typ 16 reagieren schnell unter Photokomproportionierung zum Dimer 18, Beispiele sind Oxalsäure, Mandelsäure und EDTA.
- 3) Nur das Cyclohexadien-Addukt kann in die vollständig reduzierte Stufe 9 zerfallen, um dann zum Dimer 18 zu reagieren.
- 4) Die Bildung von 18a scheidet bei den beschriebenen Photoreaktionen aus. Sie kann nur mit "Dunkel-Addukten" wie $\text{dFl}_{\text{red}}^{\text{H-5-CN}}$ 35 in anschließenden Photokomproportionierungen gezeigt werden.

2.6. Weitere Photoreaktionen in der 5-Deazaflavin- bzw. der 5-Deazalumichromreihe

Parallel zur vorliegenden Arbeit wurden gemeinsam mit W. BAUCH^{54,100)} die 5-Deazaflaviniumsalze photochemisch untersucht. Die von BAUCH^{54,101)} dargestellten 5-Deazaflavinium-perchlorate 29 reagieren nahezu völlig analog zu den oben erwähnten 5-Deazaflavinen.

Das nachfolgende Schema zeigt den Verlauf der anaeroben Photoreaktionen, bei denen, wie in der Flavinreihe und in der Deazaflavinreihe, verschiedene Substrate eingesetzt werden können.



Je nach Wahl des Substrates bleibt auch hier die Reaktion teilweise auf der Adduktstufe **30** stehen, oder es reagiert dieses Addukt mit einem weiteren Molekül **29** in einer sekundären Photoreaktion zu einem Dimeren **31**, welches sich von dem ausführlich beschriebenen Dimeren **18** nur durch eine Methylgruppe in 1- bzw. 1'-Stellung unterscheidet. Der Mechanismus unterscheidet sich demnach nicht von dem der 5-Deazaflavinreihe (s.S. 84).

Wie in orientierenden Versuchen festgestellt wurde, reagieren auch die in unserem Arbeitskreis untersuchten 5-Deazalumichrome photochemisch. Auch dort scheint es sich um einen ähnlichen Reaktionsverlauf zu handeln¹⁰²⁾.

Tabelle 13 zeigt die Reaktivitätsunterschiede der drei untersuchten Substanzklassen.

Tabelle 13:

Relative Umsatzgeschwindigkeiten bei Photoreaktionen
in $H_2O/pH=4$

Substrat	5-Deaza- flavin <u>1</u>	5-Deaza- flaviniumsalz <u>29</u>	5-Deaza- lumichrom <u>32</u>
	V_{rel}	V_{rel}	V_{rel}
Oxalsäure	57	2	1
Mandelsäure	100	13	10
EDTA	6.6	5.7	5

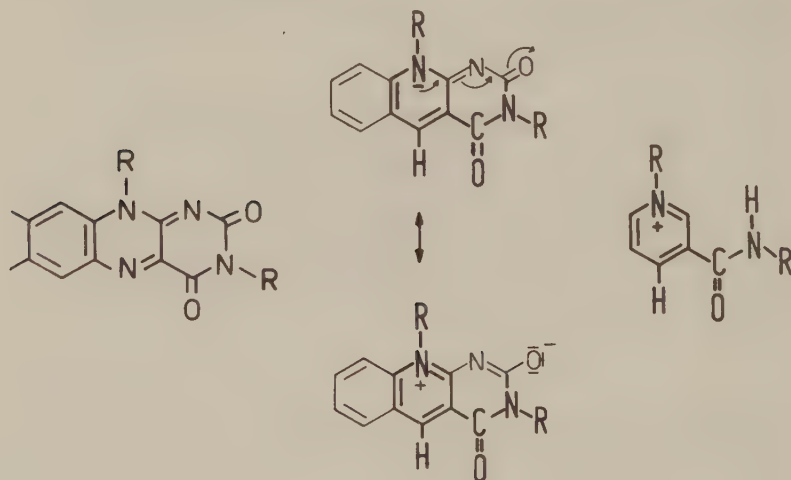
Bei den Angaben handelt es sich um relative Umsatzgeschwindigkeiten V_{rel} , bezogen auf die Reaktion von 5-Deazalumichrom mit Oxalsäure bei $pH = 4$.
Reaktionsbedingungen s. Tab. 6.

Die Tabelle zeigt deutlich, daß die Deazaflavine photochemisch am reaktivsten sind. Durch Vergleich mit Flavinen ist leicht einzusehen, daß auch nur noch die Deazaflavine teilweise Flavincharakter haben, während z.B. die Deazaflaviniumsalze vielmehr dem NAD^+ ähnlich werden, welche ihrerseits in photochemischen Reaktionen lange nicht so reaktiv sind wie die Flavine.

3. THEORETISCHER TEIL II (DUNKELREAKTIONEN)

5-Deazaflavine wurden im theoretischen Teil I und nahezu in der gesamten bisher erschienenen Literatur^{2-7,9,11-13,17)} als flavinanaloge Verbindungen betrachtet, und das sowohl in den chemischen wie enzymologischen Arbeiten.

In Zusammenarbeit mit den Arbeitsgruppen HEMMERICH und MASSEY konnte aufgrund gemeinsamer Untersuchungen gezeigt werden, daß Deazaflavin weniger ein Flavinmodell, als vielmehr ein Nikotinamidmodell ist, welches allerdings von der Struktur wie ein Flavin aussieht. ("Flavin-shaped nicotinamide model")^{8,10,30,92,94)}.



In der obigen Abbildung sieht man deutlich das ähnliche sterische Aussehen der Flavine und Deazaflavine, aber durch den isosterischen Austausch des Stickstoffes in 5-Position durch die Methingruppe ist 1.5.-azachinoide Redoxsystem des Flavins blockiert, welches die Ursache für die Reversibilität der Redoxreaktionen in der Flavinreihe ist. Mit Hilfe der

Methingruppe wird aber in das Flavinmolekül ein Strukturinkrement eingeführt, das ebenfalls in biologischen Reaktionen ein Redoxsystem darstellt. Dieses Redoxsystem stellt die Verwandtschaft zwischen Deazaflavinen und Nikotinamiden her, und sollte dazu führen, daß Deazaflavine in einigen Reaktionen (Redoxreaktionen) sich den Nikotinamiden analog verhalten (s. Einleitung).

Diese Analogie sollte sich in folgenden Reaktionen zeigen lassen:

1. Redoxreaktionen^e ohne Einwirkung von Licht! (In den Lichtreaktionen verhält sich Deazaflavin in vielen Fällen flavinanalogs)
 - a) Reaktionen der oxidierten Stufe,
 - b) Reaktionen der Radikalstufe,
 - c) Reaktionen der vollständig reduzierten Stufe.
2. Reaktionen mit nucleophilen Reagenzien, da in der Nikotinamidreihe mit Nucleophilen charakteristische Additionsreaktionen beobachtet werden ⁴⁶⁻⁵⁰).

3.1. Redoxreaktionen in der Deazaflavinreihe

Wie unter 3. ausgeführt und unter 2.1.2. angedeutet, müssen auch die Dunkelreduktionen von $dFl_{ox} \underline{1}$ noch einmal unter dem Gesichtspunkt der Nikotinamid-Analogie betrachtet werden. Dabei erscheint es sinnvoll, auch solche Reaktionen in Augenschein zu nehmen, die in der Literatur^{9,11,17}) ausreichend dokumentiert erscheinen. So wird dFl_{ox} von Borhydrid und Dithionit zum 1.5-Dihydroderivat 9 reduziert (s.a. 2.1.2.), wie bereits von verschiedenen Autoren^{9,17}) berichtet, aber diese Bruttoreaktion sagt nichts über den Reaktionsverlauf aus.

Bei diesen Reaktionen erweist sich $dFl_{ox} \underline{1}$ als ausgesprochen guter Hydrid-Akzeptor, was durch die schnelle $2e$ -Reaktion mit Borhydriden gezeigt werden kann¹⁰). Im Gegensatz dazu sind

Flavine nur sehr schwache Hydrid-Akzeptoren, da die Reduktion mit BH_4^- im Dunkeln sehr langsam vor sich geht und Photoaktivierung für eine quantitative Reaktion notwendig ist.¹⁰³⁾ Sie ist ebenfalls langsamer als die vergleichbare Reaktion mit NAD^+ oder nikotinamidanalogen Modellverbindungen.

Demgegenüber handelt es sich bei der Reaktion von Deazaflavinen mit Dithionit um eine sehr langsame Reaktion⁹⁾, die in der Flavinreihe wiederum anders abläuft. PALMER et al.¹⁰⁴⁾ dokumentieren diese Reaktion als einen schnellen $1e^-$ -Transfer, bei dem in der Flavinreihe die Semichinonstufe durchlaufen wird, und ein intermediäres SO_2^- Radikal gebildet wird. In der Deazaflavinserie ist die langsame Bildung von $\text{dFl}_{\text{red}}\text{H}_2$ 9 augenscheinlich auf die Bildung eines intermediären Sulfinat-Adduktes zurückzuführen, welches auch in der Nikotinamidreihe beobachtet wurde.^{48,105,106)}



Dieses schnell gebildete Addukt wird dann langsam in einer zweiten Reaktion zu $\text{dFl}_{\text{red}}\text{H}_2$ 9 hydrolysiert, ebenso wie das Addukt in der Nikotinamidreihe, welches Sulfit und reduziertes Nikotinamid ergibt.



Damit verhält sich Dithionit nicht wie in der Flavinreihe als $1e^-$ Donator, sondern gegenüber Deazaflavinen und Nikotinamiden als $2e^-$ Donator.

An diesen zwei einfachen Beispielen von $1e^-$ und $2e^-$ -Reduktionen ist also der Unterschied zwischen Flavinen und Deazaflavinen gezeigt, ebenso ist die deutliche Verwandtschaft von Deazaflavinen und Nikotinamiden zu erkennen. Auf den Vergleich der oxidierten Stufe von Flavinen, Deazaflavinen und Nikotinamiden gegenüber nucleophilen Reagenzien, und damit auf den Carbanionen-Transfer wird weiter unten noch ausführlich eingegangen.

3.1.1. Darstellung von 5-Deazaflavin-Radikalen und deren Eigenschaften

In der Flavinserie ist die halbreduzierte Stufe, also die Radikalstufe, essentiell, so daß neben dem $2e^-$ Transfer bei biologischen Redoxreaktionen auch der $1e^-$ Transfer möglich ist. Bei einer weitgehenden Analogie von Flavinen und Deazaflavinen müßte sich eine Ähnlichkeit der beiden Moleküle in sämtlichen Redoxstufen auffinden lassen, also auch in der Semichinonstufe.

In der Flavinreihe konnte gezeigt werden¹⁰⁷⁾, daß die Radikalstufe stabil ist, während für Nikotinamide ein solches Verhalten nicht zu beobachten war.

Unter physiologischen Bedingungen sind 2 Formen von Flavin-Radikalen zu beobachten¹⁰⁷⁻¹⁰⁹⁾. Durch Addition von e^- entsteht zunächst das rote Radikal $\dot{F}l^-$, welches einen pK-Wert von ca. 8.5 hat¹⁰⁹⁾, und bei Protonierung an N(5) das blaue Neutralradikal 5-HF1 ergibt, welches dann disproportionieren kann.^{30,110)}

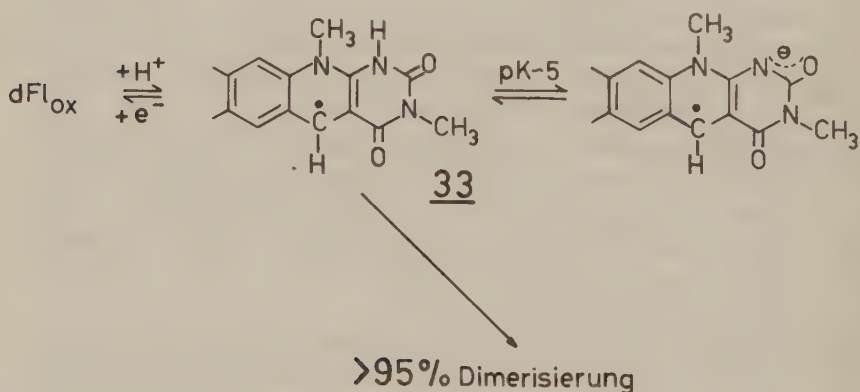
Formal ist es bei Deazaflavin ebenso möglich, ein durch Addition eines Elektrons analoges rotes Radikal $d\dot{F}l^-$ zu formulieren. Auch hier sollte eine Protonierung möglich sein, die aber mit hoher Wahrscheinlichkeit nicht in Position (5), d.h. an der Methingruppe, sondern am Stickstoff in Position (1) erfolgen sollte. Ein weiteres Proton in 5-Stellung würde die cyclische Resonanz- und Spindellokalisierung im Chromophor nicht begünstigen, und damit ein 5-Hd $\dot{F}l$ Radikal äußerst instabil machen^{8,10)}. Aber auch ein 1-Hd $\dot{F}l^-$ Radikal 33 sollte thermodynamisch extrem instabil sein.

Die Experimente zur Bildung dieses Radikals bestätigen diese Hypothese, denn es ist nur möglich, mit drastischen Reaktionsbedingungen das Radikal zu erhalten:

- a) Pulsradiolyse⁵⁶⁾,
- b) Blitzlichtphotolyse¹⁰⁾,
- c) Elektrochemische Reduktion¹⁰⁾.

Bei allen drei Methoden kann gezeigt werden, daß ein Intermediär entsteht, welches bei 530 nm absorbiert. Mit Hilfe der Blitzlichtphotolyse wird hierbei das photochemisch erhaltene Dimer 18 in seine Monomeren gespalten, woraus auch zwanglos eine 1-H-Struktur folgt, da die C(5)-C(5')-Bindung labil ist.

Wie schon oben gezeigt, dimerisieren diese Radikale zu mindestens 95 % wieder, was auch folgende Übersicht zeigt:



Die Radikale verhalten sich damit völlig nikotinamidanalogue, dessen halb reduzierte Stufe ebenfalls quantitativ dimerisiert¹¹¹⁾. Eine Disproportionierung, wie in der Flavinderie wird bei photo- und elektrochemischer Bildung nicht beobachtet. Tabelle 14 zeigt noch einmal die Stabilität der Deazaflavinradikale im Vergleich zu verwandten Verbindungen.

Tabelle 14: Radikalstabilität von Flavinen u. N(5)Modifikationen

Struktur	$\lambda_{\max}$ (nm)	Zerfallsreaktion	Lit.
1-HdFl	530	schnell, Dimer.	10)
5-HdFl	nicht beobacht.		
NAD [•]	400	schnell, Dimer.	111)
5-RF1	580	schnell, Dispro.	107, 112)
1/2 α -RF1	470	schnell, Dispro.	108)
5-sF1	675	langsam, Dispro.	22)

Aus der Tabelle ist damit abzulesen, daß die 5-Deazaflavin-Radikale nicht flavinanalogue reagieren, während eine andere Modifikation des Flavinsystems, das 5-Thiaflavin, eine äußerst stabile Radikalstufe bildet, die sich in ihren Reaktionen flavinanalogue verhält.

Biologisch hat das Deazaflavin-Radikal für den e^- Transfer demzufolge keine Bedeutung, auch wenn JORNS & HERSH⁵⁾ an einem Deazaflavoprotein eine artifizielle Radikalstabilisierung zeigen konnten.

3.1.2. Reaktionen der unterschiedlichen Redoxstufen mit verschiedenen Oxidationsmitteln

Die Reaktivität des vollständig reduzierten Zustandes $dFl_{red}H_2$ ist an den Reoxidationsreaktionen gut zu beobachten. In Tab.15 sind die Reaktionen mit verschiedenen Oxidationsmitteln zusammengefaßt, zum Vergleich sind die Reaktionen des Dimers $(dFlH)_2$, des Flavins und des Nikotinamids aufgeführt.

Aus dieser Tabelle geht hervor, daß sich die Ähnlichkeit zwischen 5-Deazaflavinen und Nikotinamiden in den Dunkelreaktionen auch im reduzierten Zustand zeigt. Die spektroskopischen Daten (s.S. 24) gaben hier schon die ersten Hinweise.

Deazaflavin und Nikotinamid werden jeweils sehr langsam durch O_2 oxidiert - Flavin aber sehr schnell. Mit $1e^-$ Akzeptoren reagiert Flavin ebenfalls schnell - $dFl_{red}H_2$ und NADH reagieren auch hier sehr viel langsamer. Bei den Reaktionen untereinander nimmt 5-Deazaflavin eine Mittelstellung zwischen Flavin und Nikotinamid ein.

Die Komproportionierung von Flavin ($Fl_{red}H_2 + Fl_{ox}$) ist sehr schnell, eine solche Reaktion führt zur Radikalbildung, die in der Deazaflavinreihe nicht beobachtet wird. Hier tritt ein langsamer Hydrid-Austausch zwischen reduziertem und oxidiertem Deazaflavin auf¹⁷⁾. Eine ähnliche Reaktion ist bei Nikotinamiden noch sehr viel langsamer¹¹⁷⁾.

Tabelle 15:

Reoxidationsreaktionen der reduzierten Formen des Deazaflavins im Vergleich mit Flavinen und Nikotinamiden

Oxidations- mittel	dFl _{red} H ₂	(dFlH) ₂	Fl _{red} H ₂	NADH
<u>Dunkel- reaktionen</u>				
1e ⁻				
Fe(CN) ₆ ³⁻	>10 ² 98)	3·10 ³ 98)	>10 ⁸ 114)	langsam 113)
Cytochrom c	>10 ² 98)	1.4·10 ² 98)	>10 ⁷ 113)	sehr langsam ¹¹³⁾
1e ⁻ /2e ⁻				
O ₂	sehr langsam	schneller ~10	sehr schnell ¹¹⁴⁾	keine Ox.
Phenazin- methosulfat	4.2·10 ⁴ 113)	" ~3 113)	sehr schnell ¹¹³⁾	~5·10 ² 113)
Fl _{ox}	1.7·10 ² (2e ⁻) ⁹⁸⁾	langsamer als 60(1e ⁻) ⁹⁸⁾	~5·10 ⁸ (1e ⁻) ¹¹⁵⁾	0.16 (2e ⁻) ¹¹⁹⁾
2e ⁻				
dFl _{ox}	22 17)	langsamer als 10 ¹⁰⁾	thermo- dynamisch	84 116)
NAD	?	nicht bestimmt	nicht durch- führbar	≥ 2·10 ⁻³ 117)
<u>Licht- reaktionen</u>				
O ₂ (dFl _{ox} sens.)	Φ=0.2 10)	Φ=0.6 10)	Dunkelreaktion zu	---
Fl _{ox}	Dunkelreakt. zu schnell	Φ=0.6 10)	schnell	---
dFl _{ox}	Φ=0.4 10)	Φ=0.5 10)	?	---

Φ = Quantenausbeute ± 0.1

Geschwindigkeitskonstanten 2. Ordnung M⁻¹s⁻¹

Daraus folgt, daß 5-Deazaflavine und Nikotinamide nur zwei Elektronenschritte ausführen können, im Gegensatz zu Flavinen, die $1e^-$ - oder $2e^-$ -Transfer möglich machen können.

Weiterhin sind aus Tab. 15 die Unterschiede im Reoxidationsverhalten der verschiedenen reduzierten Spezies in der Deazaflavinreihe abzulesen. Daraus wird deutlich, daß das Dimer mit $1e^-$ -Akzeptoren (Ferricyanid und Cytochrom c) schneller reagiert als die vollständig reduzierte Stufe, während mit $2e^-$ -Akzeptoren (Deazaflavin selbst) die reduzierte Stufe schneller reagiert¹⁷⁾. $dFl_{red}H_2$ bevorzugt also die $2e^-$ -Oxidation, hingegen das Dimer die $1e^-$ -Oxidation.

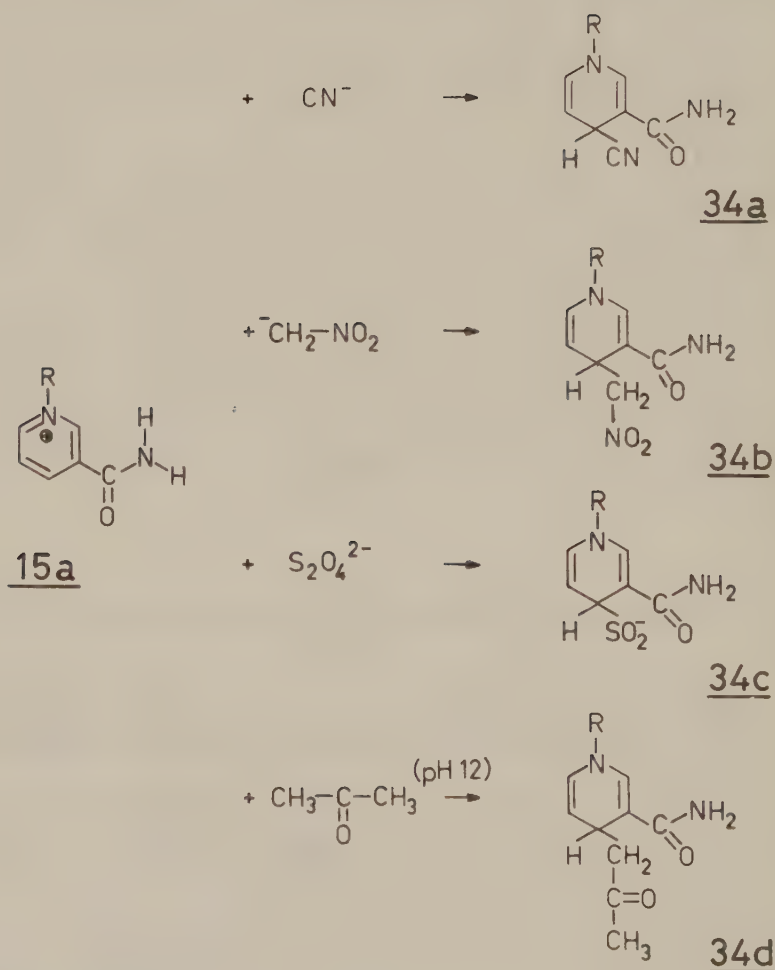
Mit Flavinen reagiert $dFl_{red}H_2$ schneller als das Dimer, woraus deutlich wird, daß in der Oxidoreduktion von Flavinen und Deazaflavinen der $2e^-$ -Transfer bevorzugt wird. Da Nikotinamide und Flavine ebenfalls einen $2e^-$ -Transfer untereinander zeigen, folgt daraus, daß sich auch in diesen Reaktionen 5-Deazaflavin wie ein Nikotinamid-Modell verhält.

3.2. Reaktion von Deazaflavin mit nucleophilen Reagenzien

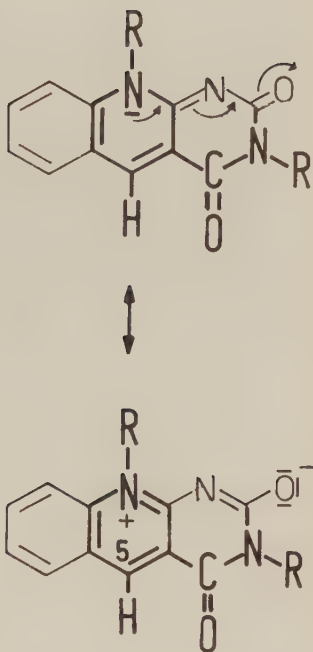
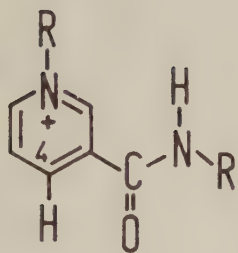
Da sich, wie eingangs des Kapitels bereits erwähnt, dFl_{ox} in vielerlei Hinsicht nicht wie ein Flavin verhält, war zu erwarten, daß sich verschiedene nukleophile Partner an Deazaflavin addieren lassen.

Grundlage dieser Untersuchungen waren die umfangreichen Arbeiten von WALLENFELS⁴⁶⁻⁴⁹⁾ und KRÖHNKE^{50,118,119)}. Dort wurde gezeigt, daß an Nikotinamid und analoge Modellverbindungen leicht nucleophile Partner in die 4-Stellung angelagert werden können. Schema 14 zeigt einige Reaktionsmöglichkeiten dieser bei WALLENFELS und KRÖHNKE untersuchten Modellverbindungen. Neben der Addition in 4-Stellung ist es auch möglich, daß nucleophile Partner in 2- oder 6-Stellung addiert werden können, für die weitere Betrachtung spielen diese Isomeren aber nur eine untergeordnete Rolle.

Schema 14:



In der Gegenüberstellung wird deutlich, daß die 4-Stellung der Nikotinamide und die 5-Stellung der Deazaflavine einander äquivalent sind.



Die Analogie zwischen Nikotinamid und Deazaflavin erstreckt sich damit nicht nur auf den halbreduzierten und den reduzierten Zustand, sondern auch auf den oxidierten Zustand, obwohl die Deazaflavine nur eine positive Teilladung in 10-Stellung tragen, im Gegensatz zu Nikotinamiden, die echte Kationen darstellen.

3.2.1. Addition von Cyanid und Sulfit

Aufgrund der in der Nikotinamidreihe genannten Beispiele wird 5-Deazaflavin mit den gleichen Reagenzien im Dunkeln umgesetzt. Durch folgende mesomere Grenzformeln von dFl_{ox} wird die Elektronendefizienz der 5-Stellung und damit der Angriff von

Nucleophilen in dieser Position deutlich.

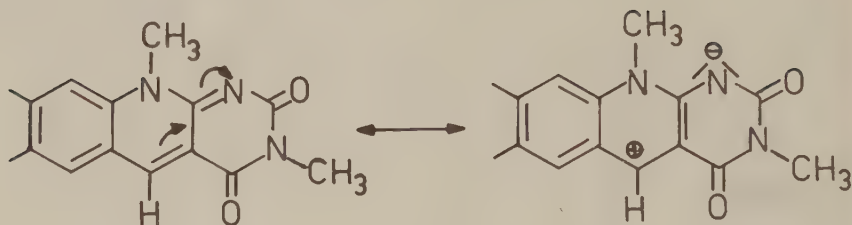
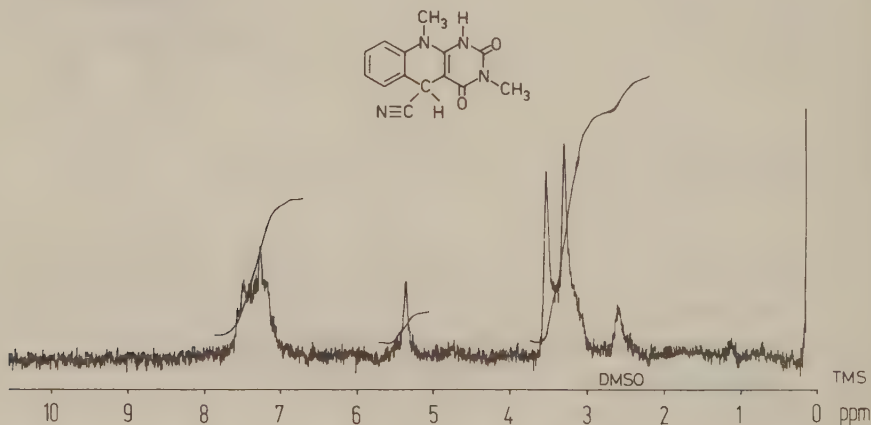


Abbildung 15 zeigt das NMR-Spektrum des Cyanid-Additionsproduktes 35, welches durch Zugabe einer wässrigen Lösung von KCN zu einer methanolischen Lösung von Deazaflavin erhalten wird.

Abbildung 15:

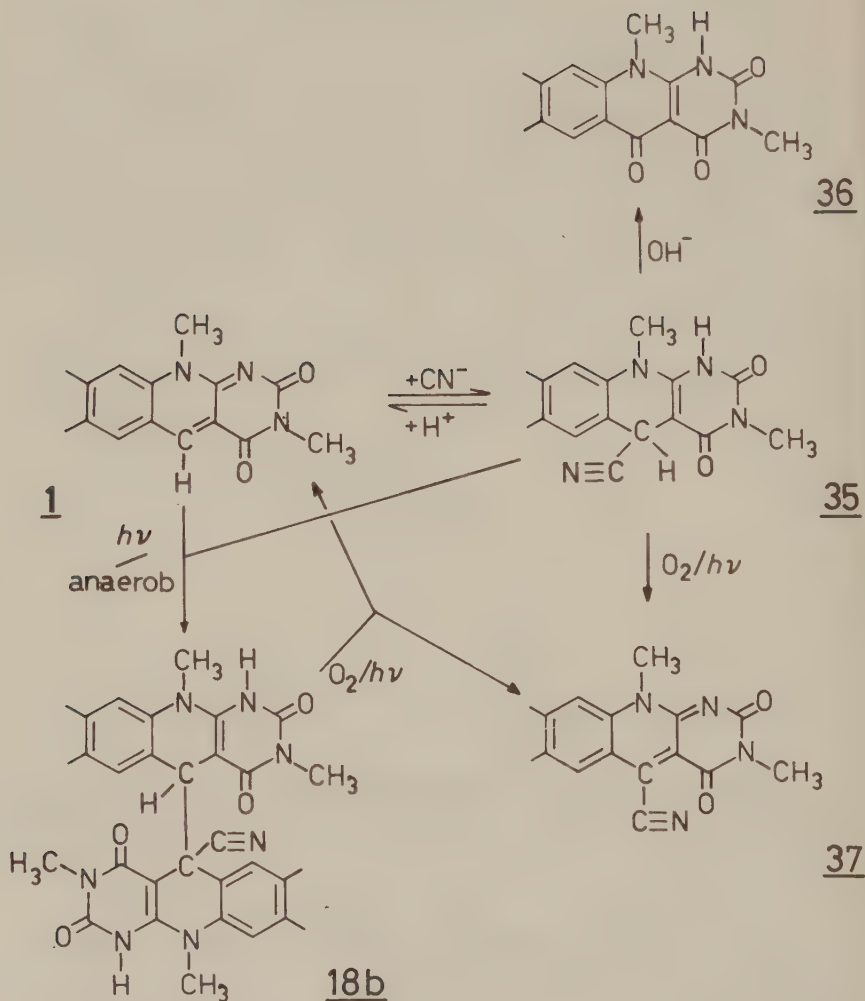


¹H-NMR-Spektrum (100 MHz) von 35 in DMSO-d₆. Das N-H(1) Proton bei 10.90 ppm ist mit D₂O bereits ausgetauscht.

Das Spektrum zeigt deutlich ähnliche chemische Verschiebungen wie die schon erwähnte reduzierte Verbindung dFl_{red}H₂ 9. Das gilt besonders für die Methyl-Gruppen in 3- und 10-Stellung, die Aromatenprotonen und das austauschbare N-H-Proton in 1-Stellung. Die einzige Ausnahme ist das Proton in 5-Stellung, welches gegenüber der vergleichbaren CH₂ Gruppe bei

$\delta_{\text{redH}_2}^{\text{Fl}}$ um 1.65 ppm von $\delta = 3.65$ ppm nach $\delta = 5.30$ ppm verschoben ist. Dieser Befund zeigt deutlich, daß in die 5-Stellung ein elektronenziehender Substituent (die CN-Gruppe) eingeführt wurde, der die Abschirmung der Protonen verringert, und das Signal für das CH-Proton zu tiefem Feld verschiebt. Bei der Cyanid-Addition ist darauf zu achten, daß der pH-Wert der Lösung nicht zu alkalisch wird, da sonst aus dem Cyanid Addukt 35 durch intermediäre Addition von OH^- Ionen und anschließender Abspaltung von HCN als Endprodukt das 5-Keton 36 ⁵⁴⁾ entsteht. Eine ähnliche Nebenreaktion findet man auch in der Nikotinamidreihe. ¹²⁰⁾

Schema 15:

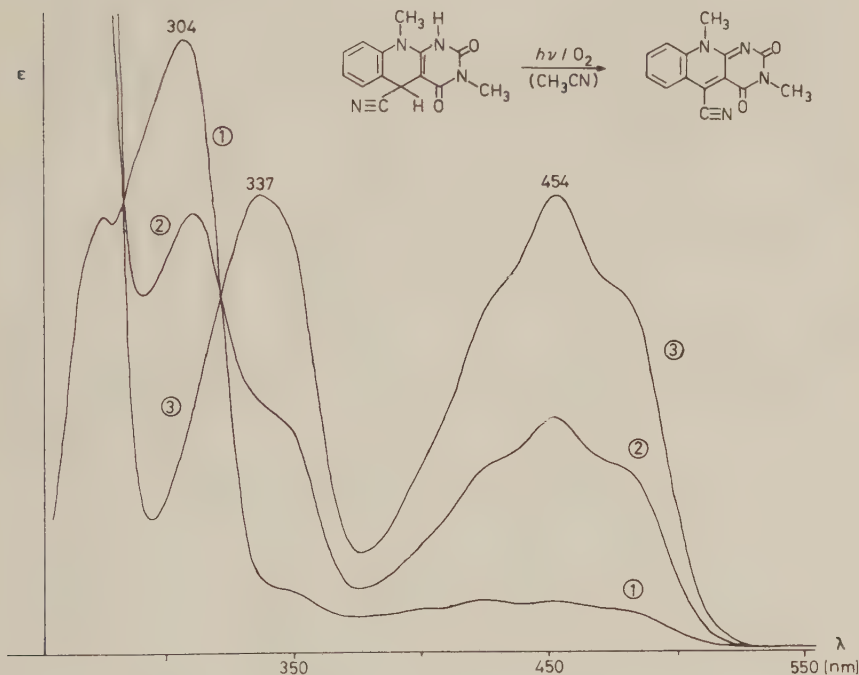


Schema 15 zeigt alle diese Reaktionsmöglichkeiten.

Das Cyanid-Addukt ist mit Säure wieder spaltbar, d.h. es wird bei Zugabe von H^+ Ionen in seine Ausgangskomponenten zerlegt,

was einer Reoxidation gleichkommt. Versucht man dagegen, so wie bei $\text{dFl}_{\text{red}} \text{H}_2$ 2, das Cyanid-Addukt 35 mit Sauerstoff unter Bestrahlung in dFl_{ox} 1 zu überführen, gelingt das nicht, sondern es kann vielmehr gezeigt werden, daß das Addukt zwar oxidiert wird, aber unter Zurücklassung der Cyanid-Gruppe in der 5-Stellung. Das folgende UV-Spektrum zeigt die eben beschriebene Oxidation zu dFl_{ox} 5-CN 37.

Abbildung 16:



Photooxidation des Cyanid-Adduktes 35 (Kurve 1) in CH_3CN zu dFl_{ox} 5-CN 37 (Kurve 3). Bestrahlungsdauer: Kurve 1 = 0 sec;
 Kurve 2 = 20 sec;
 Kurve 3 = 80 sec.

Aus dem Spektrum wird eine bathochrome Verschiebung von 37 gegenüber dFl_{ox} 1 um ca. 60 nm von 393 nm auf 454 nm deutlich. Dafür ist die Cyanid-Gruppe in 5-Stellung verantwortlich, die in Konjugation zum chromophoren System des Deazaflavinsystems steht, was durch die folgenden mesomeren Grenzformeln von 37 verdeutlicht werden soll.

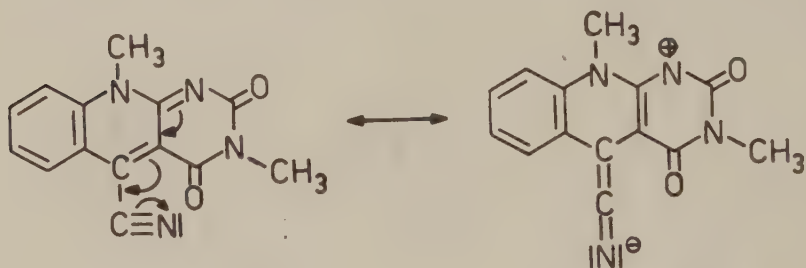
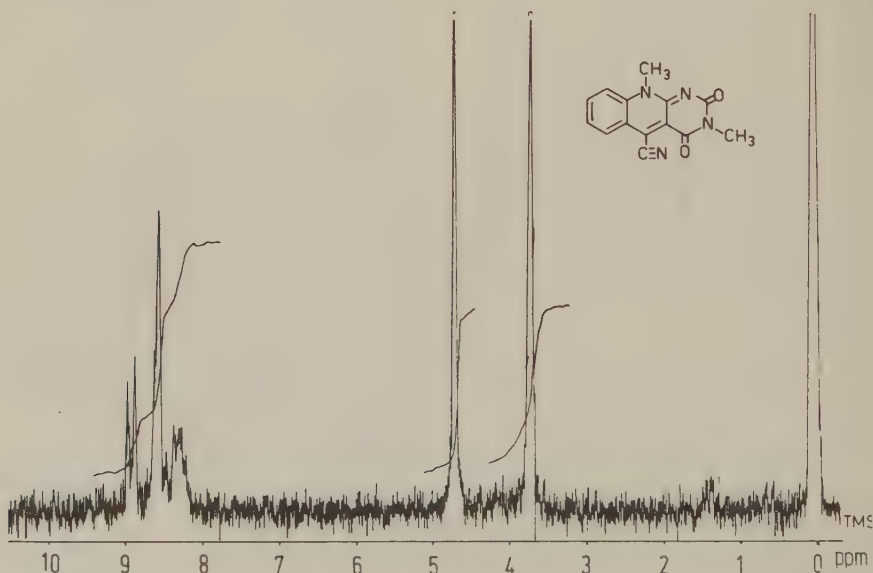


Abbildung 17:

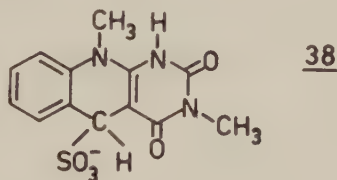


1H -NMR-Spektrum (100 MHz) von 37 in CF_3COOD .

Die Struktur des durch Reoxidation erhaltenen 5-Cyano-5-deazaflavin 37 wird durch das NMR-Spektrum in Abb. 17 belegt. Das für Deazaflavine charakteristische Methinproton in 5-Stellung bei tiefem Feld ($\delta = 9.90$ ppm in CF_3COOD) fehlt hier, so daß nur auf die obige Struktur geschlossen werden kann.

Alle anderen Signale werden bei ähnlichen chemischen wie bei dFl_{ox} 1 gefunden, und weisen auf das ähnliche Grundgerüst der beiden Verbindungen hin.

Wie mit Cyanid-Ionen können auch mit anderen anorganischen Ionen Addukte mit Deazaflavinen erhalten werden. Setzt man Deazaflavine mit wässriger Na_2SO_3 Lösung um, so entsteht ein Produkt, welches im Gegensatz zu $\text{dFl}_{\text{red}}\text{H}_2$ nicht bei 316 sondern bei 307 nm absorbiert. Diesem Produkt wird in der Literatur folgende Struktur zugeschrieben:¹¹⁾



Die Daten dieser Verbindung stimmen mit denen des Cyanid-Adduktes überein (s. Tab. 16) und untermauern die o.g. Struktur.

Tabelle 16:

Spektroskopischer Vergleich von $\text{dFl}_{\text{red}}\text{H-5-CN}$ 35 und $\text{dFl}_{\text{red}}\text{H-5-SO}_3^-$ 38.

UV-Daten		<u>35</u>	<u>38</u>
λ_{max} (ϵ in $\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) pH=7		306 nm (13000)	307 nm (12500)
NMR-Daten		in DMSO-d_6	D_2O
δ -Werte in ppm			
	N(3)- CH_3	3.17	3.33
	N(10)- CH_3	3.41	3.33
	C(5)-H	5.30	5.13
	Arom	7.00-7.57	6.70-7.70
	N(1)-H	10.90	-

1 Signal

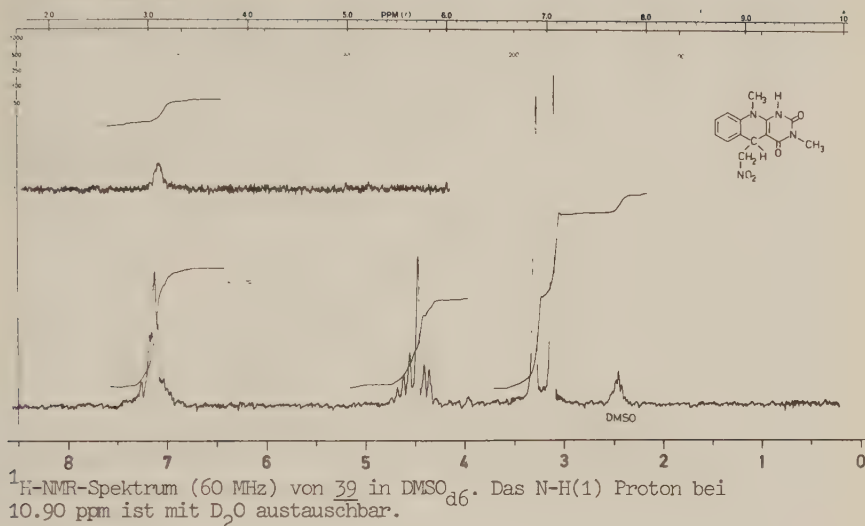
3.2.2. Addition von Carbanionen

Wie in der Nikotinamid-Reihe können auch Carbanionen an 5-Deazaflavine addiert werden. An einigen ausgewählten Beispielen soll die Reaktivität der Deazaflavine gezeigt werden und die Struktur der Endprodukte aufgeklärt werden. Parallel zur vorliegenden Arbeit wurden auch 5-Deazaflaviniumsalze in ihrer Reaktivität gegenüber nucleophilen Reagenzien untersucht und ähnliche Ergebnisse erhalten.⁵⁴⁾ Auch die Addition von Nucleophilen an 5-Deazaflavoproteine wurde bereits orientiert untersucht.⁷⁾ Aus der Vielfalt der in der Nikotinamid-Reihe verwendeten Reagenzien werden zwei einfache Beispiele ausgewählt, Nitromethan und Aceton.

In einem ausführlichen Papier über die Reaktionsmöglichkeiten von 5-Deazaflavinen erwähnen schon SPENCER et al.¹⁷⁾ die Reaktion von 5-Deazariboflavin mit Nitroäthan. Die Reaktion wird dort allerdings nur im analytischen Maßstab durchgeführt und die pH-Abhängigkeit überprüft. Die Autoren finden dabei eine Reaktion, die ein Verschwinden des langwelligen Maximums der 5-Deazaflavine bei 393 nm zur Folge hat und postulieren eine 5-Addition der Nitroäthylgruppe, da sie ein Produkt erhalten, das mit Säure wieder in seine Ausgangskomponenten zerlegt werden kann. Unter geeigneten Bedingungen ist es möglich, bei der Umsetzung mit Nitromethan bei pH = 12 ein Additionsprodukt darzustellen, welches dann bei pH = 7 isoliert werden kann. Die Abbildung 18 zeigt ein so erhaltenes Nitromethan-Addukt 39 mit seinem NMR-Spektrum.

Wie schon bei photochemisch dargestellten Addukten ausgeführt, (s.S. 50) ähneln auch die chemischen Verschiebungen des Nitromethanproduktes sehr denen der vollreduzierten Spezies $dFl_{red}H_2$ 9. Das gilt für die N-Methylgruppen, die Aromatenprotonen und das mit D_2O austauschbare N-H-Proton in 5-Stellung. Durch die elektronenziehende Nitrogruppe in 5 α -Position, werden die Signale dieser Protonen durch geringere Abschirmung nach tiefem Feld verschoben. Die Kopplungskonstanten der Protonen untereinander sind nicht zu erkennen, da die Signale

Abbildung 18:



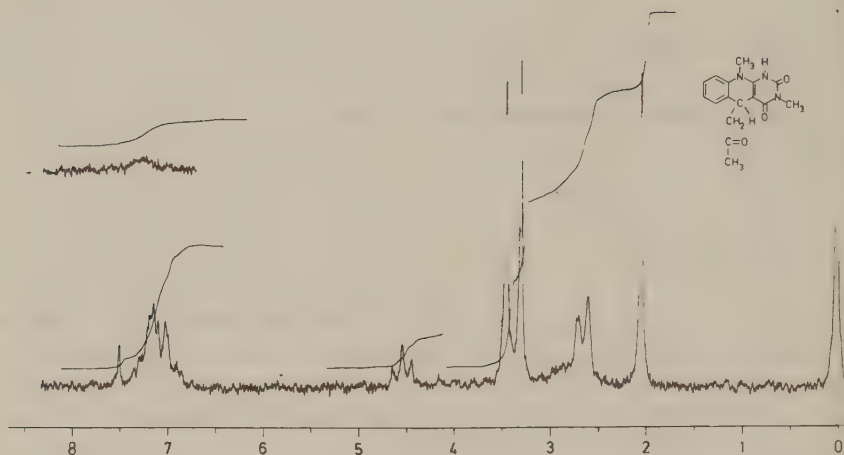
zu einem Multiplett bei $\delta = 4.32\text{--}4.80$ ppm überlagert sind. Die Addition der Nitromethylgruppe in 5-Stellung ist dennoch zweifelsfrei bewiesen, was auch das IR-Spektrum durch seine charakteristischen Banden bei 1375 und 1490 cm^{-1} für Nitrogruppen unterstreicht.

Dieses Nitromethan-Addukt 39 verhält sich chemisch völlig ähnlich dem analogen Addukt in der Nikotinamidreihe, es ist z.B. mit Säuren wieder leicht in die Ausgangskomponenten spaltbar.

Während eine Addition von Carbanionen in der Flavinreihe nur bei besonders elektronendefizienten Flavinen (8-Cyano-isoalloxazin¹²¹) gefunden wurde, ist diese Reaktion in der Pyridinium-, Chinolinium- und Nikotinamidreihe schon lange bekannt^{46-50,118,119}). Die Interpretation, daß sich 5-Deazaflavine viel mehr nikotinamid- als flavinanalogue verhalten, trifft damit auch für diese Reaktionen zu.

Ein weiteres Beispiel der Reaktion mit Carbanionen ist die Addition von Aceton im basischen Milieu. Die Abbildung 19 zeigt das NMR-Spektrum des Reaktionsproduktes 40 von

Abbildung 19:

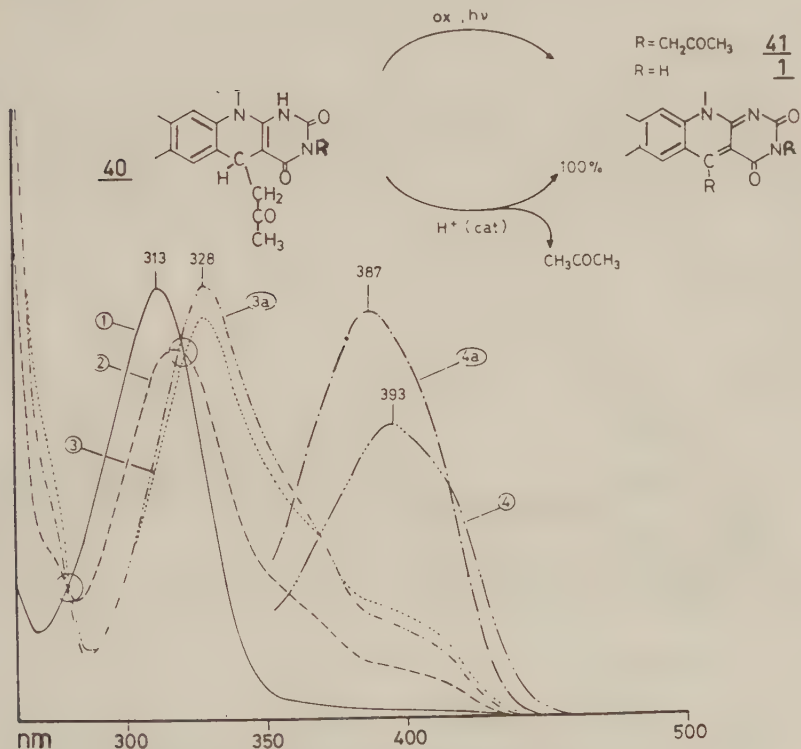


^1H -NMR-Spektrum (60 MHz) von 40 in CDCl_3 . Das N-H(1) Proton bei 10.50 ppm ist mit D_2O austauschbar.

5-Deazaflavin mit Aceton bei pH = 12 in CDCl_3 . Neben den drei Singulets $\delta = 2.05, 3.33$ und 3.50 ppm für die drei Methylgruppen, dem Aromatenmultiplett bei $\delta = 6.85 - 7.45$ ppm und dem mit D_2O austauschbaren N-H-Proton bei 10.50 ppm sind noch zwei aufgespaltene Signale zu erkennen. Sie sind eindeutig dem C-H(5) Proton des Deazaflavinmoleküls und der CH_2 -Gruppe des Acetylrestes zuzuordnen. Dabei spaltet das CH(5) Proton aufgrund der Nachbarschaft der Methylengruppe zu einem Triplett bei $\delta = 4.55$ ppm mit einer Kopplungskonstante von 6 Hz auf, während die Methylengruppe ein Zweiprotonenduplett bei $\delta = 2.65$ ppm mit der gleichen Kopplungskonstante bildet. Die Nachbarschaft dieser Protonen ist damit eindeutig bewiesen, was wiederum einer 5-Addition am Deazaflavinmolekül entspricht.

Die Bildung stabiler Addukte mit Aceton wird in der Flavinderie überhaupt nicht beobachtet. Vielmehr verhält sich das Deazaflavin wie ein Nikotinamid Derivat, was auch die vollständige Reversibilität der Reaktion (s. Abb. 20) mit Säure beweist.

Abbildung 20:



Säure- und photokatalysierte Spaltung des Adduktes 40:

Kurve 1: 40 Start, Kurve 1 $\rightarrow$ 3: 40 + 0.1 N HCl,

Kurve 3a: Vergleich dFl_{ox} 1 in 0.1 N HCl,

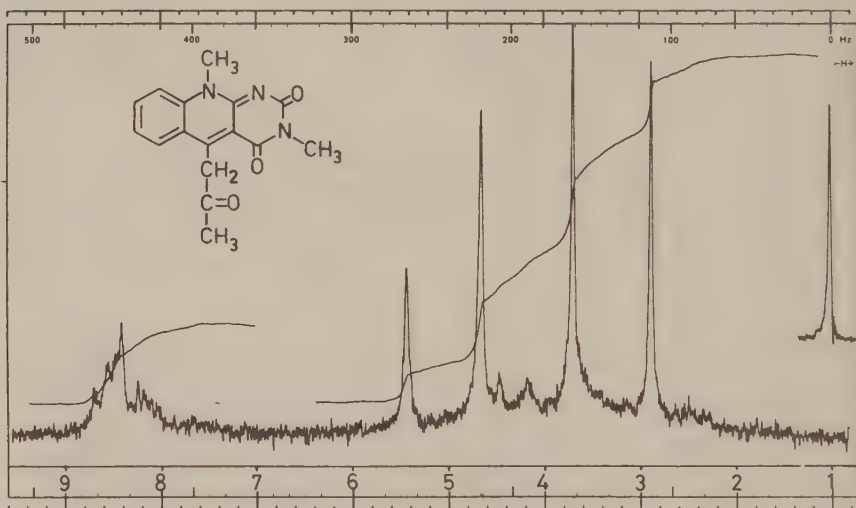
Kurve 4: 40 + h v $\rightarrow$ 41,

Kurve 4a: Vergleich dFl_{ox} 1 bei pH = 7.

Während das Acetonyl-Addukt 40 mit Säure wieder in seine Ausgangskomponenten gespalten werden kann, gelingt dies nicht, ebenso wie beim Cyanid Addukt 35, durch Reoxidation mit

Sauerstoff unter Lichteinwirkung (s. Abb. 20). Es ist zwar möglich, die reduzierte Spezies zu reoxidieren, allerdings unter Zurücklassung des Acetylrestes in 5-Stellung. Der Acetylrest in 5-Stellung beeinflusst das chromophore System des Deazaflavin nur wenig, so daß die Unterscheidung zu unsubstituiertem dFl_{ox} 1 aufgrund von Elektronenspektren nur schwer getroffen werden kann. Erst Abb. 21 zeigt diesen Unterschied deutlich.

Abbildung 21:



¹H-NMR-Spektrum (60 MHz) von 41 in CF₃COOD.

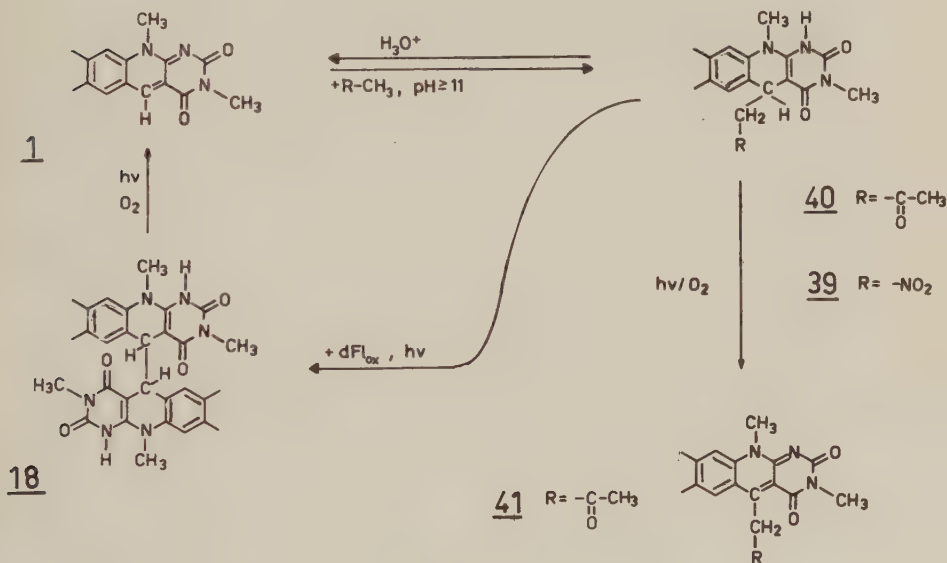
Beim NMR-Spektrum in Trifluoressigsäure sind dabei die Signale des Grundkörpers zu beobachten, die bei ähnlichen chemischen Verschiebungen (N(3)-CH₃ δ = 3.70, N(10)-CH₃ δ = 4.65, Arom δ = 7.90-8.80 ppm) wie beim unsubstituierten dFl_{ox} 1 erscheinen. Statt des Methin-Protons in 5-Stellung sind allerdings zwei neue Signale zu beobachten.

1. Die Methylengruppe, die aufgrund der Nachbarschaft der 4a, 5-Doppelbindung zu tiefem Feld verschoben ist (δ = 5.45 ppm) und als Zweiprotonensingulett erscheint.

2. Die Methylgruppe in 5 β -Stellung, die aufgrund der Nachbarschaft der Ketogruppe ebenfalls zu tiefem Feld verschoben ist (δ = 2.90 ppm) und als Dreiprotonensingulett auftritt. Damit ist die obige Struktur 41 bewiesen, mit der auch die anderen spektralen Daten übereinstimmen (s. exp. Teil).

Schema 16:

Carbanionen-Addition in 5-Deazaflavin



Schema 16 zeigt die eben besprochenen Reaktionsmöglichkeiten. Dabei ist auch beschrieben, daß die Addukte 39 und 40 mit dFl_{ox} Dimerisierungsreaktionen eingehen können. (s.S. 73) Deazaflavin zeigt neben der Fähigkeit, ein guter Hydrid-Akzeptor zu sein, auch die Eigenschaften eines Carbanionen-Akzeptors. Flavin dagegen ist, wie in 3.1. gezeigt, ein ausgesprochen schlechter Hydrid-Akzeptor, zeigt aber auch gegenüber

Carbanionen wenn auch schwache Akzeptoreigenschaften. Diese Carbanionenreaktionen wurden in vielen Fällen nicht als solche erkannt, da die intermediären Addukte in der Flavinsreihe instabil sind und solvolytisch in Radikale zerfallen können. Aufgrund der Weiterreaktion sollte aber nicht die Primärreaktion also die Fähigkeit für Carbanionen-Transfer von Flavinen übersehen werden.

Der oxidierte Zustand dFl_{ox} ist damit aufgrund der Hydrid-Akzeptor-Eigenschaften und der großen Reaktivität gegenüber Nucleophilen in seinen Dunkelreaktionen nicht Flavin- sondern weitestgehend Nikotinamid-analog.

4. ZUSAMMENFASSUNG

Die Resultate der vorliegenden Dissertation ermöglichen eine Beantwortung der beiden Kernfragen, die in der Problemstellung präzisiert worden waren. Dazu sollten die verschiedenen Redoxstufen des Deazaflavins in ihren Eigenschaften charakterisiert werden, um diese Daten mit denen der Flavine und Nikotinamide vergleichen zu können.

a) Reaktivität des oxidierten Zustandes (dFl_{ox})

Es konnte gezeigt werden, daß Deazaflavine, ebenso wie Nikotinamide¹²²⁾, im Gegensatz zu Flavinen gute Hydridakzeptoren sind. Die Umsetzung mit Dithionit ist dagegen langsam und deutet auf die Bildung eines 5-Sulfinat-Adduktes hin. Solche Additionen mit nachfolgender Hydrolyse zur vollständig reduzierten Verbindung werden in der Nikotinamidreihe beobachtet.^{48,105,106)}

Neben der Fähigkeit, mit Hydrid-Ionen zu reagieren, hat die elektronendefiziente 5-Stellung auch die Neigung Carbanionen anzulagern, wodurch der Nikotinamidcharakter deutlich wird, bei denen schnelle Carbanionen-Additionen beobachtet werden.^{46,50)} Als Beispiele hierfür wurden die Additionsprodukte mit Aceton, Nitromethan und Cyanid isoliert und deren Struktur aufgeklärt.

Die vergleichbare Reaktion bei Flavinen ist langsam und führt erst bei stark elektronendefizient substituierten Flavinen zu stabilen Addukten, z.B. 8-CN- Fl_{ox} .¹²¹⁾ Das zeigt, daß Flavin zwar ein schlechter Hydrid-Akzeptor, jedoch ein "mäßiger" Carbanionen-Akzeptor ist. Diese Eigenschaft wird durch Licht³²⁾ und den Proteinanteil in Enzymen erheblich verstärkt.^{123,124)} Außerdem besitzt Deazaflavin ebenso wie Nikotinamid bei Aktivierung des Substrates im basischen Milieu die Fähigkeit, einfache Alkohole zu oxidieren⁹²⁻⁹⁴⁾

Während sich in diesen Dunkelreaktionen keine nennenswerte Analogie zwischen Deazaflavin und Flavin zeigen läßt, wurde für die photochemische Reaktivität des oxidierten Zustandes eine deutliche Flavinähnlichkeit festgestellt. Reaktionen

des Triplettzustandes verlaufen jeweils über eine Addition von Substrat -- bei Flavinen in 4a-, bei Deazaflavinen in 5-Position. Während sich diese Initialreaktionen gleichen, weisen die Addukte eine unterschiedliche Stabilität auf. Bei Deazaflavinen wird eine Photokomproportionierung des Adduktes 16 mit weiterem $^3\text{dFl}_{\text{ox}}^*$ beobachtet, aus der ein acridinanaloges Dimeres 18 in zwei diastereomeren Formen resultiert. Dabei wird unabhängig von der Struktur des Substrates qualitativ immer die gleiche Reaktionsfolge gefunden. Die photochemische und säurekatalysierte Umwandlung der beiden Diastereomeren (d,l- und Meso-Form) ineinander wurde untersucht. Der Mechanismus der Photoreduktion wurde mit Hilfe von deuterierten Deazaflavinen aufgeklärt. Die vollständig reduzierte Stufe $\text{dFl}_{\text{redH}_2}$ 9 ist in keinem Fall als photochemisches Endprodukt zu finden - wie in der Flavinreihe beobachtet - da $\text{dFl}_{\text{redH}_2}$ ebenfalls mit $^3\text{dFl}_{\text{ox}}^*$ photokomproportioniert.

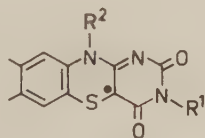
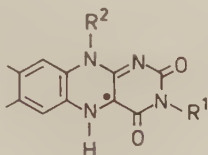
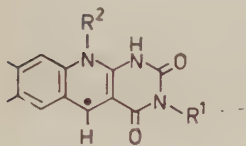
Damit bestätigt sich der von EDMONDSON et al.¹⁾ postulierte Verlauf der Photoreaktion von Deazaflavinen mit EDTA zum Dihydrodeazaflavin 9 als Endprodukt nicht. Eine ähnliche Beobachtung von SONG et al.¹³⁾ bei der Photoreduktion von dFl_{ox} mit NADH zu $\text{dFl}_{\text{redH}_2}$ muß auf eine mögliche Dimerenbildung noch untersucht werden.

b) Reaktivität der halb reduzierten Stufe ($\text{dFlH}^\bullet$)

Im Zusammenhang mit der Bildung des Dimeren und dessen Eigenschaften steht auch das Verhalten der Radikalstufe, obwohl das Radikal als Zwischenprodukt während der Photokomproportionierung ausgeschlossen werden kann. Das bedeutet, daß kein e^- -Phototransfer unter Bildung des Radikals und anschließender Dimerisierung eintritt, sondern Photoaddition mit anschließender Homolyse. Dieses Radikal ist im Gegensatz zur Flavinreihe instabil, vielmehr stabilisiert es sich unter erneuter Dimerisierung. Eine Disproportionierung wie in der Flavinreihe wird nicht beobachtet.¹²⁵⁾ Hier verhält sich die Radikalstufe wie der Nikotinamid-analog: Nikotinamid Radikale dimerisieren quantitativ.¹¹¹⁾ Die Reaktivität des Radikals begründet auch

die Anwendung dieses Systems zur Reduktion von Flavoproteinen in zwei Einelektronenschritten. (s.S. 63)⁹⁸⁾

Die Unterschiede in der Radikalstruktur werden aus dem Vergleich von $d\dot{F}lH$ mit $\dot{F}lH$ und $s\dot{F}lH$ deutlich:



Durch Protonierung am N(1) eines durch e^- -Addition entstandenen Anionenradikals entsteht ein Neutralradikal, welches kinetisch und thermodynamisch instabil ist, da der sp^3 -Kohlenstoff in Position (5) eine tricyclische Resonanz blockiert. Eine höhere Stabilität findet man im 5-ständig protonierten Flavinradikal und im 5-Thiaflavinradikal^{18,22)}, welches sich in seinen Reaktionen erwartungsgemäß flavinanalogue verhält. Zusammenfassend zeigt sich also, daß 5-Deazaflavine im Gegensatz zu Flavinen und 5-Thiaflavinen nur eine sehr geringe Affinität für einzelne Elektronen besitzen.

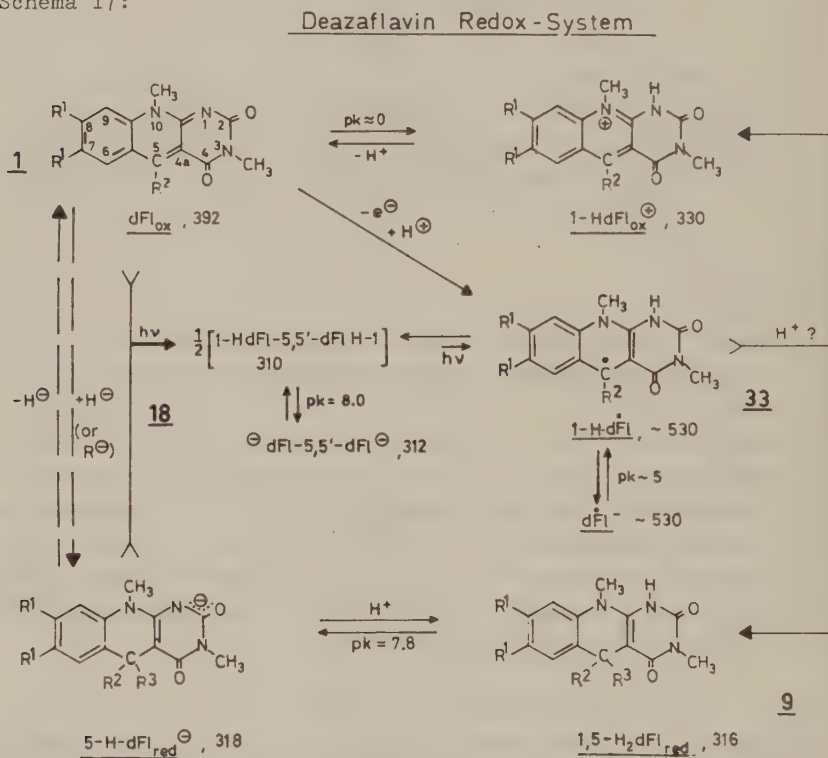
c) Reaktionen der reduzierten Stufe ($dFl_{red}H_2$)

Aus Kapitel 3.1.2. ist ersichtlich, daß die Ähnlichkeit von Deazaflavinen und Nikotinamiden in der reduzierten Stufe am auffallendsten ist. Reoxidationsreaktionen zeigen, daß Deazaflavine und Nikotinamide nur sehr langsam - im Gegensatz zum Flavin - mit Sauerstoff reagieren. Die Unterschiede zwischen $dFl_{red}H_2$ und $Fl_{red}H_2$ in ihrer Reaktion mit O_2 werden an anderer Stelle ausführlich diskutiert.^{8,10,126)}²⁾

Ebenso oxidieren $1e^-$ -Akzeptoren das Deazaflavinsystem wesentlich langsamer die vergleichbare Flavinredoxstufe. Es wird also auch darin deutlich, daß die Radikalstufe instabil und dadurch ein $1e^-$ -Transfer erschwert ist.

Die wichtigsten Redoxreaktionen des 5-Deazaflavinsystems und die Strukturen der beteiligten Spezies sind in Schema 17 dargestellt.

Schema 17:



Insgesamt läßt sich das 5-Deazaflavinsystem in zutreffender Weise als "Flavin-shaped Nikotinamid" beschreiben. In allen Redoxstufen kann es nikotinamidähnliche Reaktionen ausführen. Für die Flavine ist es ein Modell, das die Untersuchung Flavin-katalysierter Redoxreaktionen gestattet, in denen Hydrid bzw. $2e^-$ -Transfer involviert ist.

5. EXPERIMENTELLER TEIL

5.1. Meßgeräte, Apparaturen

Elektronenspektren

Registriert mit folgenden Geräten:

1. Cary-14R (CARY, Monrovia, USA)
 2. Varian 635M mit XY-Flachbrettschreiber 235 (VARIAN, Darmstadt)
 3. Superscan (VARIAN, Darmstadt)
- Als Meßzellen dienen Quarzküvetten QS (HELLMA, Müllheim, Baden)
Verwendete Abkürzungen: sh = Schulter

Fluoreszenzspektren

Spektralfluorimeter MPF-3 (PERKIN-ELMER)

Als Meßzellen dienen Quarzküvetten QS (HELLMA, Müllheim, Baden)
Intensitäten werden auf 5-Deazaflavin bezogen.

IR-Spektren

Gitterspektrometer 621 (PERKIN-ELMER)

Gemessen in KBr-Preßlingen (0,3 - 0,5 mg Substanz auf ca. 200 mg KBr)

Die Lage der Banden wird in Wellenzahlen (cm^{-1}) angegeben.

Massenspektren

Einfach fokussierendes Massenspektrometer CH-7 (VARIAN-MAT, Bremen) mit direkter Einführung der Probe in die Ionenquelle.

¹H-NMR-Spektren

Registriert mit folgenden Geräten:

- 1.60 MHz-Spektrometer A-60A (VARIAN, Palo Alto, USA)
Meßtemperatur: 310 ± 2 K, Fehler: $\Delta\delta = \pm 0,03$ ppm, $\Delta J = \pm 0,5$ Hz
- 2.90 MHz-Spektrometer HFX-90 (BRUKER, Karlsruhe)
Meßtemperatur: 296 ± 1 K, Fehler: $\Delta\delta = \pm 0,01$ ppm, $\Delta J = \pm 0,2$ Hz
- 3.100 MHz-Spektrometer XL-100 (VARIAN, Palo Alto, USA)
Meßtemperatur: 303 ± 1 K, Fehler: $\Delta\delta = \pm 0,01$ ppm, $\Delta J = \pm 0,2$ Hz
- 4.100 MHz-Spektrometer (JEOL, Japan)
Meßtemperatur: 310 ± 1 K, Fehler: $\Delta\delta = \pm 0,01$ ppm, $\Delta J = \pm 0,2$ Hz

Weitere allgemeine Angaben:

Innere Standards:

1. Tetramethylsilan (TMS)
2. 2.2.3.3-Tetradeutero-3-(trimethylsilyl)-propionsäure-Natrium-salz (für wässrige Lösungen)

Die deuterierten Lösungsmittel sind von der Fa. MERCK, Darmstadt bzw. Fa. SHARP & DOHME, München; ausgenommen für spezielle Versuche DMSO-d₆. (Reaktor Würenlingen, Schweiz; gegenüber kommerziellen Produkten höherer Deuterierungsgrad > 99,9 % und geringerer Wassergehalt).

Die Zuordnung der Kopplungen wird in einigen Fällen in Doppelresonanz durch Spinentkopplung überprüft, die Multiplizitäten mit s = Singulett, d = Dublett, dd = Doppel-Dublett, t = Triplett, q = Quartett und m = Multiplett abgekürzt.

Schmelzpunkte

1. Kofler-Heizblock
2. Linström-Gerät

In beiden Fällen wurden die Schmelzpunkte nicht korrigiert.

Elementaranalysen

Die Elementaranalysen wurden auf einem automatischen C-H-N-Analyser der Fa. PERKIN-ELMER im Analysenlabor des pharmazeutischen Institutes der FU Berlin durchgeführt.

Dünnschichtchromatographie

Als stationäre Phase dient Kieselgel G nach Stahl (MERCK, Darmstadt) in einer Schichtdicke von 0,25 mm auf Glasplatten.

Als Fließmittel werden folgende Lösungsmittelgemische verwendet:

- a) Benzol/Diisopropyläther/Äthanol/Aceton 4/4/2/1
- b) Chloroform/Äthanol 9/1

Die Flecken werden durch Fluoreszenz oder, falls die Substanzen nicht fluoreszieren, durch Absorption von molekularem Jod sichtbar gemacht.

pH-Werte

Messung jeweils vor und nach der Photoreaktion mit einem Präzisions-pH-Meter (Fa. KNICK, Berlin) in Verbindung mit einer Mikroelektrode (Fa. METROHM, Schweiz) bestimmt und arithmetisch gemittelt.

Chemikalien

Die verwendeten Chemikalien sind vom höchsten handelsüblichen Reinheitsgrad und werden falls nötig weiter gereinigt. Nicht im Handel befindliche Chemikalien werden nach Literaturangaben hergestellt. Dem Labor von Herrn Prof. Dr. P. Hemmerich und besonders Herrn Dr. W.R. Knappe bin ich für die Überlassung einiger Substanzen zu großem Dank verpflichtet.

Analytische Photoreaktionen

Als Lichtquelle für die kinetischen Untersuchungen wurde ein Kleinbilddiaprojektor PERKEO S 250 der Fa. ZEISS verwendet, der mit einer 250 W/24 V Wolfram-Halogen-Niedervoltlampe und einem asphärischen Kondensorsystem mit Wärmefilter, das von ca. 320-800 nm lichtdurchlässig ist, ausgerüstet ist. Die Küvette wird in ca. 2 cm Entfernung von der Dia-Ebene fixiert und ist dort gleichmäßig ausgeleuchtet. Die Reaktionstemperatur liegt zwischen 22 und 25°C und wegen des Wärmefilters ist keine Kühlung notwendig. Diese geringe Temperaturdifferenz ist als unbedenklich anzusehen. Die Beleuchtungsstärke würde mit einem Belichtungsmesser "Trilux" der Fa. GOSSEN, Gießen zu ca. 420.000 Lux bestimmt. Bestrahlungsintensität: $0.1 \cdot 10^{16}$ Quanten/cm²s.

Der Spektralbereich des Lichtes wurde entweder durch einen Interferenzfilter 405 nm oder durch einen Breitbandinterferenzfilter K₁ der Fa. BALZERS, Liechtenstein begrenzt. Die Fehlergrenze dieser Messungen liegt bei ca. $\pm 10\%$, da bei den Messungen kein Spannungsstabilisator zur Verfügung stand.

Standardbedingungen der kinetischen Messungen

Die Reaktionen werden in 10 mm-Quarz-Küvetten mit einer Schliffhülse und aufgesetztem Hahn mit 2,5 ml (Photoreaktionen in Wasser) oder mit 3 ml (Photoreaktionen in Acetonitril oder Benzol) Reaktionslösung durchgeführt. Zunächst wird in allen Fällen überprüft, ob Substratlösung und die 5-Deazaflavinlösung keine Dunkelreaktionen miteinander eingehen. Danach werden für die Reaktionen in wässriger Lösung zunächst 0,5 ml 0,02 M Substratlösung, 1,0 ml 0,1 M Pufferlösung und 1,0 ml $\text{ca. } 10^{-4}$ M 5-Deazaflavinlösung miteinander vermischt und durch Einleiten (20 min) von Argon anaerobisiert. (Argon der Fa. LINDE, München wird mit Hilfe eines "Deoxo-Gasreinigers" der Fa. HERAEUS, Hanau katalytisch nachgereinigt und damit vom Sauerstoff bis auf 1 ppm befreit). Diese so behandelten Küvetten sind damit für mindestens 12 Stunden anaerob.

Danach werden die Kinetiken mit Hilfe der oben beschriebenen Apparatur aufgenommen. Nach Aufnahme der Photoreduktionskinetik wird die Küvette mit Luft gefüllt, 10 Sekunden im Dunkeln geschüttelt und nach insgesamt 60 Sekunden die Extinktion bei 400 nm abgelesen.

Für die Lichtreoxidation wird die Küvette erneut bestrahlt und wiederum die Extinktion bei 400 nm abgelesen.

Präparative Photoreaktionen

Lichtquelle: 125 W Quecksilberhochdrucklampe der Fa. PHILIPS als Tauchbrenner in wassergekühltem Mantel aus Pyrexglas.

Apparatur: zylindrisches Reaktionsgefäß (70 mm Innendurchmesser und 600 ml Reaktionslösung) mit Gaseinleitungsrohr, Blasen-zähler und Magnetrührer. Die Ansätze werden durch 30-minütiges Einleiten von Argon anaerobisiert, und die Reaktion durch Abnahme der Absorption bei 400 nm kontrolliert. Die Reaktionstemperatur entspricht der Kühlwassertemperatur ($\text{ca. } 15^{\circ}\text{C}$).

5.2. Allgemeine Vorschrift zur präparativen Darstellung der Photoprodukte

5.2.1. Reaktionen in wässriger Lösung

500 mg 3.10-Dimethyl-5-deaza-isoalloxazin 1 (0,0021 Mol) werden in ca. 400 ml einer wässrigen Lösung suspendiert, die 0,05 Mol des entsprechenden Substrates enthält. Die Lösung wird mit verdünnter NaOH auf den jeweils gewünschten pH-Wert eingestellt und anschließend mit einem kontinuierlichen Strom von Argon anaerobisiert. Das Reaktionsgefäß ist im Kapitel Meßgeräte und Apparaturen bereits beschrieben. An Hand der Absorption bei 400 nm wird die Reduktion des 5-Deaza-isoalloxazins beobachtet. Wenn diese auf nahezu 0 abgesunken ist, wird die Reaktion abgebrochen. Die Dauer des photochemischen Reduktionsvorganges beträgt je nach Substrat von 30 Minuten bis zu 96 Stunden. Wenn bei schwach saurem pH-Wert (ca. 4-5) gearbeitet wird, fällt das reduzierte Deazaflavin aus. Das ausgefallene Photoprodukt wird abgesaugt, mit Methanol und Aether vorsichtig gewaschen und im Ölpumpenvakuum über P_2O_5 getrocknet. Bei schwach basischem pH-Wert gehen bei vielen Reaktionen die Photoprodukte in Lösung. In diesem Fall wird die Lösung angesäuert (wobei das Produkt ausfällt) und dann wie oben aufgearbeitet. Da die Verbindungen in den meisten Fällen oxidationsempfindlich sind, wird auf eine Reinigung durch Umkristallisieren verzichtet.

5.2.2. Reaktionen in Acetonitril

500 mg 3.10-Dimethyl-5-deaza-isoalloxazin 1 (0,0021 Mol) und 0,05 Mol des entsprechenden Substrates werden in ca. 400 ml Acetonitril gelöst. Dann wird wie oben angegeben vorgegangen, und die Reaktion je nach Substrat bei 2 bis zu 100 Stunden abgebrochen. Das Lösungsmittel wird am Rotationsverdampfer bis zu einem Volumen von ca. 20 ml abgezogen. Der Rest wird dann mit Aether versetzt, wobei das Photoreduktionsprodukt ausfällt.

Zur vollständigen Kristallisation wird die Lösung über Nacht in den Kühlschrank gestellt; das Produkt wird dann abgesaugt mit Äther gewaschen und im Ölpumpenvakuum über P_2O_5 getrocknet. Auf Umkristallisieren wird aus den oben genannten Gründen ebenfalls verzichtet.

5.3. Synthese der Ausgangsverbindungen

- 3.10-Dimethyl-5-deaza-isoalloxazin (1) *)

Diese Substanz wird nach einer Methode von O'BRIEN et al.¹⁾ dargestellt. Dabei werden N-Methyl-anthranilaldehyd und N-Methyl-barbitursäure 4 h in Methanol unter Rückfluß erhitzt, nach Erkalten die ausfallende Verbindung abgesaugt und aus sehr viel Methanol umkristallisiert.

Ausbeute: 12,0 g = 44,8 % d.Th.

Schmp.: 317-319°C

Analyse für $C_{13}H_{11}N_3O_2$ (MG: 241.21)

ber.: C: 64.67 % H: 4.56 % N: 17.41 %

gef.: C: 64.61 % H: 4.62 % N: 17.36 %

Spektroskopische Daten

IR (KBr): 1620 (C=O), 950 (olef. C-H), 780 cm^{-1} (arom. C-H).

UV (Methanol): λ_{max} (log ϵ) = 393 (4.079), 323 (4.079),
256 (4.732), 218 nm (4.633).

(6N HCL) : λ_{max} (log ϵ) = 330 (4.360), 253 nm (4.722).

(CH_3CN) : λ_{max} (log ϵ) = 416 (sh), 397 (4.130), 376 (sh),
315 (4.033), 307 (sh), 262 (4.738)
218 nm (4.618).

*) Nach IUPAC-Nomenklatur wird diese Verbindung als 3.10-Dimethyl-pyrimido-[4.5-b]-chinolin-2.4-(3H,10H)-dion bezeichnet. Der Grundkörper ist bei allen synthetisierten Verbindungen der gleiche u. wird aus Gründen der Analogie zum Flavin bzw. Isoalloxazin als 5-Deaza-isoalloxazin bezeichnet. Daher werden alle anderen Verbindungen nicht rationell benannt, sondern als Derivate des 5-Deaza-isoalloxazin betrachtet.

<u>$^1\text{H-NMR}$</u>	(δ -Werte)	$\text{DMSO-}d_6/\text{CDCl}_3$ 1:3	CF_3COOD
N(3)- CH_3 ,s		3.28	3.70
N(10)- CH_3 ,s		4.00	4.60
Arom. ,m		7.32-8.03	7.90-8.60
C(5)-H ,s		8.73	9.90

MS (70eV):m/e=241 (100%, M^+), 184 (48%), 156 (41 %), 129 (29%).
(250°C)

Fluoreszenzspektrum (Methanol) : λ_{max} 455 nm
Einstrahlung bei 393 nm (Acetonitril) : λ_{max} 452, 465 nm(sh)
(H_2O) : λ_{max} 455 nm

- 1.5-Dihydro-3.10-dimethyl-5-deaza-isoalloxazin (9)

Diese Substanz ist schon bei BRÜSTLEIN und BRUICE¹¹⁾ beschrieben, wird aber zu Vergleichszwecken nach drei verschiedenen Methoden erneut dargestellt.

1. Reduktion mit Natriumdithionit

Die Substanz 1 (0,01 Mol = 2,41 g) wird in ca. 100 ml Methanol suspendiert und dann im Überschuß mit wässriger $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ -Lösung versetzt. Diese Lösung wird entweder bis zur Entfärbung über Nacht gerührt oder kurzzeitig auf 60°C bis sich die Lösung entfärbt erhitzt. Nach Abkühlen wird angesäuert und mit ca. 200 ml Wasser verdünnt. Dabei fällt die reduzierte Verbindung aus. Sie wird abgesaugt, mit wenig Methanol und Aether gewaschen und im Ölpumpenvakuum bei 60°C getrocknet.
Ausbeute: 2,01 g = 83,4 % d.Th.

2. Reduktion mit Natriumborhydrid

Verbindung 1 (0,01 Mol = 2,41 g) wird in 50 ml Dimethylsulfoxid gelöst, mit einigen Spatelspitzen NaBH_4 versetzt und ca. 30 min gerührt. Nachdem sich die Lösung entfärbt hat, wird mit verdünnter Essigsäure angesäuert um überschüssiges NaBH_4 zu entfernen. Dann werden 200 ml Wasser hinzugesetzt, wobei eine weiße Verbindung ausfällt. Diese wird wie oben aufgearbeitet.
Ausbeute: 2,31 g = 95,0 % d.Th.

3. Reduktion mit H_2 unter Zusatz von 10 % Palladium/Kohle

Verbindung 1 (0,01 Mol = 2,41 g) wird in 150 ml Dimethylformamid gelöst und unter Zusatz von 500 mg Katalysator (10 % Palladium/Kohle) unter Normaldruck bei ca. 50°C hydriert. Nach beendiger Wasserstoffaufnahme wird der Katalysator abfiltriert, das Filtrat im Vakuum auf ca. 50 ml eingengt und das Reduktionsprodukt mit 200 ml Wasser ausgefällt. Die Substanz wird wie oben beschrieben aufgearbeitet.

Ausbeute: 1,93 g = 79,4 % d.Th.

Der Schmelzpunkt erwies sich bei allen drei Methoden als der gleiche.

Schmp.: 283°C

Analyse für $C_{13}H_{13}N_3O_2$ (MG: 243,27)

ber.: C: 64,19 % H: 5,34 % N: 17,28 %
 gef.: C: 64,33 % H: 5,37 % N: 17,12 %

Spektroskopische Daten

IR (KBr): 1690 (C=O), 1625 (C=O), 755 cm^{-1} (arom. C-H).

UV (Methanol): λ_{max} (log ϵ) = 316 (4.079), 227 nm (4.176).
 (pH = 11): λ_{max} (log ϵ) = 314 (4.051), 262 (4.362),
 246 nm (4.346).

(CH_3CN) : λ_{max} (log ϵ) = 312 (4.061), 227 nm (4.330).

<u>1H-NMR</u> (δ -Werte)	DMSO _{d6}	D ₂ O/Na ₂ CO ₃	CF ₃ COOD
N(3)-CH ₃ ,s	3.14	3.18	3.60
N(10)-CH ₃ ,s	3.33	3.27	3.77
C(5)-H ₂ ,s	3.65	3.45	3.93
Arom. ,m	6.93-7.28	6.60-7.10	7.00-7.45
N(1)-H ,s	10.10	---	---

MS (70eV): m/e = 243 (100%, M⁺), 242 (99%), 241 (94%), 228(50%),
 (225°C) 221 (16%), 197 (10%), 185 (67%), 184 (35%),
 158 (21%), 156 (17%), 155 (41%).

Fluoreszenzspektrum (H_2O /pH=8): λ_{max} = 373 nm

Einstrahlung bei 320 nm

- 3-Benzyl-10-methyl-5-deaza-isoalloxazin (3)

Darstellung nach der Methode von O'BRIEN et al.¹⁾ (Diese Verbindung ist in der Literatur noch unbekannt).

13,3 g (0,1 Mol) N-Methyl-anthranilaldehyd und 21,8 g (0,1 Mol) N-Benzyl-barbitursäure werden in 350 ml Methanol ca. 4 h unter Rückfluß erhitzt. Nach Erkalten wird die ausfallende Verbindung abgesaugt und aus Methanol unter Zusatz von 10 % Wasser umkristallisiert.

Ausbeute: 14,1 g = 44,5 % d.Th.

Schmp.: 298-299°C

Analyse für $C_{19}H_{15}N_3O_2$ (MG: 317,33)

ber.: C: 71,92 % H: 4,73 % N: 13,24 %

gef.: C: 71,43 % H: 4,84 % N: 13,34 %

Spektroskopische Daten

IR (KBr): 1630 (C=O), 1600 (C=O), 780 (arom.C-H),
700 cm^{-1} (arom.C-H).

UV (Methanol): λ_{max} (log ϵ) = 394 (4.097), 322 (4.086),
259 (4.671), 217 nm (4.656).

(6N HCL) : λ_{max} (log ϵ) = 331 (4.307), 255 nm (4.679).

(CH_3CN) : λ_{max} (log ϵ) = 413 (sh), 398 (4.121), 376 (sh),
315 (4.072), 307 (sh),
263 (4.749), 218 nm (4.642).

$^1\text{H-NMR}$ (CF_3COOD): δ = 4.60 (s, N(10)- CH_3), 5.45 (s, N(3)- CH_2),
7.30-8.70 (m, Arom), 9.85 (s, C(5)-H).

MS (70eV): m/e = 318 (33%), 317 (63%, M^+), 288 (35%), 212 (84%),
(270°C) 185 (84%), 184 (100%), 158 (68%), 155 (89%),
128 (35%).

- 3-Benzyl-1.5-dihydro-10-methyl-5-deaza-isoalloxazin (10)

Verbindung 3 (0,01 Mol = 3,17 g) wird nach der oben angegebenen Reduktionsmethode mit NaBH_4 reduziert.

Ausbeute: 3,10 g = 97,2 % d.Th.

Schmp.: 292-294°C

Analyse für $C_{19}H_{17}N_3O_2$ (MG: 319,33)

ber.: C: 71,47 % H: 5,33 % N: 13,16 %

gef.: C: 71,32 % H: 5,38 % N: 13,28 %

Spektroskopische Daten

IR (KBr): 1675 (C=O), 1620 (C=O), 740 (arom.C-H), 700 cm^{-1} (arom.C-H).

UV (Methanol): $\lambda_{max}(\log \epsilon) = 317$ (4.090), 227 nm (4.204).

(pH = 11): $\lambda_{max}(\log \epsilon) = 318$ (4.104), 262 (3.398),
247 nm (4.371).

(CH_3CN): $\lambda_{max}(\log \epsilon) = 313$ (4.079), 227 (4.279).

1H -NMR ($DMSO_{d6}$): $\delta = 3.30$ (s, N(10)- CH_3), 3.62 (s, C(5)- H_2),
4.98 (s, C(3)- H_2), 6.90-7.48 (m, Arom.),
10.40 (s, N(1)-H).

MS (70eV): m/e = 319 (23%, M^+), 318 (13%), 317 (10%),
228 (100%), 185 (53%), 158 (13%), 155 (15%).

- 3.7.8.10-Tetramethyl-5-deaza-isoalloxazin (5)

3-Methyl-5-deaza-lumiflavin (5)

Diese Verbindung wird nach einer von JANDA und HEMMERICH²¹⁾ entwickelten Methode dargestellt.

Ausbeute: 57 % d.Th.

Schmp.: 352-354°C

Analyse für $C_{15}H_{15}N_3O_2$ (MG: 269,28)

ber.: C: 66,91 % H: 5,58 % N: 15,61 %

gef.: C: 66,95 % H: 5,70 % N: 15,22 %

Spektroskopische Daten

IR (KBr): 1635 (C=O), 1610 (C=O), 785 cm^{-1} (arom.C-H).

UV (Methanol): $\lambda_{max}(\log \epsilon) = 415$ (sh), 401 (4.155), 329 (4.086),
259 (4.612), 223 nm (4.530).

(6N HCl) : $\lambda_{\max}(\log \epsilon) = 350 (4.342), 259 (4.604),$
225 nm (4.307).

(CH₃CN) : $\lambda_{\max}(\log \epsilon) = 426 (\text{sh}), 404 (4.146), 380 (\text{sh}),$
320 (4.097), 308 (sh), 263
(4.602), 223 nm (4.519).

¹H-NMR (CF₃COOD): $\delta = 2.67, 2.80 (2s, C(7,8)-CH_3), 3.65$
(s, N(3)-CH₃), 4.51 (s, N(10)-CH₃), 8.10,
8.20 (2s, C(6,9)-H), 9.65 (s, C(5)-H).

MS (70eV): m/e = 269 (100%, M⁺), 240 (28%), 213 (24 %),
(250°C) 212 (50%), 186 (28%), 184 (22%), 183 (62%),
91 (34 %).

- 1.5-Dihydro-3.7.8.10-tetramethyl-5-deaza-isoalloxazin (11)
1.5-Dihydro-3-methyl-5-deaza-lumiflavin (11)

Verbindung 5 (0,01 Mol = 2,69 g) wird nach der o.a. Reduktions-
methode mit NaBH₄ reduziert.

Ausbeute: 2,48 g = 91,5 % d.Th.

Schmp.: 350-352°C

Analyse für C₁₅H₁₇N₃O₂ (MG: 271,28)

ber.: C: 66,42 % H: 6,27 % N: 15,50 %

gef.: C: 66,30 % H: 6,18 % N: 15,41 %

Spektroskopische Daten

IR (KBr): 1690 (C=O), 1630 (C=O), 760 cm⁻¹ (arom.C-H).

UV (Methanol): $\lambda_{\max}(\log \epsilon) = 318 (4.097), 230 \text{ nm } (4.230).$

(pH = 11) : $\lambda_{\max}(\log \epsilon) = 314 (4.114), 262 (4.270),$
244 nm (4.246).

¹H-NMR (D₂O/Na₂CO₃): $\delta = 2.20 (s, C(7,8)-CH_3), 3.17 (s, N(3)-CH_3),$
3.28 (s, N(10)-CH₃), 6.80, 7.05
(2s, C(6,9)-H).

MS (70eV): m/e = 271 (82%, M⁺), 270 (100%), 269 (47%),
(35°C) 256 (53%), 213 (82%), 197 (76%).

- 3.10-Dimethyl-5-deaza-isoalloxazin-5-carbonsäure (6)

Diese Substanz wird nach einem von KING et al.⁵¹⁾ entwickelten Verfahren hergestellt.

Dabei werden 5,54 g (0,034 Mol) N-Methylisatin und 9,66 g (0,068 Mol) N-Methylbarbitursäure in ca. 250 ml konz. HCl ca. 6 h zum Sieden erhitzt. Es wird etwas n-Octanol hinzugefügt, um ein allzu starkes Schäumen zu vermeiden. Nach Eindampfen der sauren Lösung wird der Rückstand mit Wasser gewaschen und mit verdünnter warmer Natriumhydrogencarbonatlösung geschüttelt. Die Lösung wird mit Aktivkohle versetzt und filtriert. Durch Zusatz von verdünnter HCl (pH = 4) fällt die Säure als feinkristallines, gelbes Produkt aus. Der Niederschlag wird abgesaugt, mit Alkohol und Äther gewaschen und über P_2O_5 im Ölpumpenvakuum bei 100°C getrocknet.

Ausbeute: 5,1 g = 53 % d.Th.

Schmp.: 278°C (Zers.)

Analyse für $C_{14}H_{11}N_3O_4$ (MG: 285,30)

ber.: C: 58,95 % H: 3,86 % N: 14,74 %

gef.: C: 58,10 % H: 3,79 % N: 14,81 %

Spektroskopische Daten

IR (KBr): 1740 (C=O), 1715 (C=O), 1675 (C=O), 1190 (C-O).
770 cm^{-1} (arom.C-H).

UV (Methanol): $\lambda_{max}(\log \epsilon) = 406$ (sh), 389 (4.107), 323 (4.152),
310 (4.152), 256 (4.766),
223 (4.575).

(6N HCl) : $\lambda_{max}(\log \epsilon) = 332$ (4.292), 255 (4.695),
216 nm (4.526).

(CH_3CN) : $\lambda_{max}(\log \epsilon) = 429$ (sh), 408 (4.134), 388 (sh),
315 (4.173), 265 (4.826),
257 (4.808), 218 nm (4.771).

$^1\text{H-NMR}$ (δ -Werte)	$\text{DMSO}_{\text{d}6}$	CF_3COOD
$\text{N}(3)\text{-CH}_3, \text{s}$	3.25	3.55
$\text{N}(10)\text{-CH}_3, \text{s}$	4.10	4.32
Arom. ,m	7.60-8.25	8.00-8.40
$\text{C}(5)\text{-COOH},$	nicht zu erkennen	----

MS (70eV): $m/e = 285$ (18%, M^+), 271 (18%), 241 (100%), 227 (59%),
(220°C) 212 (27%), 184 (72%), 155 (91%), 129 (45%).

- 1.5-Dihydro-3.10-dimethyl-5-deaza-isoalloxazin-5-carbonsäure
(12) bzw. (16a)

Verbindung 6 (0,01 Mol = 2,85 g) wird nach der o.a. Reduktionsmethode mit NaBH_4 reduziert.

Ausbeute: 2,63 g = 92,3 % d.Th.

Schmp.: 271-274°C (Zers.)

Analyse für $\text{C}_{14}\text{H}_{13}\text{N}_3\text{O}_4$ (MG: 287,30)

ber.: C: 58,54 %	H: 4,53 %	N: 14,63 %
gef.: C: 57,88 %	H: 4,50 %	N: 14,70 %

Spektroskopische Daten

IR (KBr): 1680 (C=O), 1610 (C=O), 740 cm^{-1} (arom.C-H).

UV (Methanol): λ_{max} (log ϵ) = 311 (4.017), 227 nm (4.253).

(pH = 11): λ_{max} (log ϵ) = 308 (3.982), 260 nm (4.230).

(CH_3CN): λ_{max} (log ϵ) = 307 (4.029), 225 nm (4.312).

$^1\text{H-NMR}$ ($\text{DMSO}_{\text{d}6}$): $\delta = 3.15$ (s, N(3)- CH_3), 3.34 (s, N(10)- CH_3),
4.68 (s, C(5)-H), 6.85-7.55 (m, Arom),
10.30 (s, N(1)-H).

H der Carboxylgruppe nicht zu erkennen.

MS (70 eV): $m/e = 287$ (1%, M^+), 242 (84%), 241 (90%),
(250°C) 228 (35%), 227 (37%), 212 (30%), 185 (100%),
184 (56%), 155 (53%).

- 3.10-Dimethyl-5-deaza-isoalloxazin-5-carbonsäuremethylester(7)

Darstellung ebenfalls nach einem von KING et al.⁵¹⁾ entwickelten Verfahren. Es werden 6,44 g (0,04 Mol) N-Methylisatin und 11,36 g (0,08 Mol) N-Methylbarbitursäure in 250 ml Methanol gelöst und unter Rückfluß ein kontinuierlicher Strom von HCl 5 h lang eingeleitet. Nach Abkühlen wird der verbleibende Niederschlag abfiltriert und die Lösung am Rotationsverdampfer eingengt. Der Rückstand wird mit Natriumhydrogencarbonatlösung gewaschen und aus Methanol/Wasser (1/1) umkristallisiert. Es resultiert eine gelbe, kristalline Verbindung, die in methanolischer Lösung grün fluoresziert.

Ausbeute: 6,31 g = 53 % d.Th.

Schmp.: 320-322°C

Analyse für $C_{15}H_{13}N_3O_4$ (MG: 299,31)

ber.: C: 60,20 % H: 4,35 % N: 14,05 %

gef.: C: 59,41 % H: 4,30 % N: 14,21 %

Spektroskopische Daten

IR (KBr): 1720 (C=O), 1685 (C=O), 1640 (C=O), 1235 (C-O),
1010 (C-O), 760 cm^{-1} (arom.C-H).

UV (Methanol): $\lambda_{max}(\log \epsilon) = 405 (4.097), 325 (4.079),$
262 (4.730), 220 nm (4.529).

(6N HCl) : $\lambda_{max}(\log \epsilon) = 335 (4.274), 256 \text{ nm} (4.661).$

(CH_3CN) : $\lambda_{max}(\log \epsilon) = 430 (sh), 410 (4.127), 387 (sh),$
320 (4.079), 311 (sh),
264 (4.799), 257 (sh),
219 nm (4.661).

<u>1H-NMR</u> (δ -Werte)	DMSO- d_6	CF_3COOD
N(3)- CH_3, s	3.28	3.68
O(5)- CH_3, s	3.55	4.15
N(10)- CH_3, s	4.05	4.40
Arom, m	7.60-8.10	8.00-8.50

MS (70eV): m/e = 299 (80 %, M⁺), 285 (12%), 268 (12%), 255 (30%),
(150°C) 241 (24%), 212 (12%), 185 (24%), 184 (100%),
156 (24%), 155 (40%), 129 (24%).

- 1.5-Dihydro-3,10-dimethyl-5-deaza-isoalloxazin-5-carbon-
säuremethylester (13)

Verbindung 7 (0,01 Mol = 2,99 g) wird nach der oben ange-
gebenen Reduktionsmethode mit NaBH₄ reduziert.

Ausbeute: 2,69 g = 89,4 % d.Th.

Schmp.: 238-241°C

Analyse für C₁₅H₁₅N₃O₄ (MG: 301,31)

ber.: C: 59,80 % H: 4,98 % N: 13,95 %

gef.: C: 58,91 % H: 4,83 % N: 13,71 %

Spektroskopische Daten

IR (KBr): 1720 (C=O), 1685 (C=O), 1630 (C=O), 1000 (C-O),
750 cm⁻¹ (arom.C-H).

UV (Methanol): λ_{max} (log ε) = 311 (3.954), 230 nm (4.133).

(pH = 11): λ_{max} (log ε) = 309 (3.929), 261 nm (4.217).

(CH₃CN): λ_{max} (log ε) = 308 (3.977), 227 nm (4.238).

<u>¹H-NMR</u> (δ -Werte)	DMSO _{d6}	CF ₃ COOD
N(3)-CH ₃ ,s	3.05	3.50
O(5β)-CH ₃ ,s	3.30	3.70
N(10)-CH ₃ ,s	3.50	3.85
C(5)-H ,s	4.75	4.55
Arom. ,m	6.60-7.25	7.00-7.30
N(1)-H ,s	10.30	--

MS (70eV): m/e = 301 (6%, M⁺), 299 (12%), 243 (48%), 242 (88%),
(260°C) 185 (100%), 155 (22%), 128 (28%).

5.4. Photochemische Darstellung der Deazaflavin-Addukte

- 1.5-Dihydro-3.10-dimethyl-5-phenoxyethyl-5-deaza-isoalloxazin(16b)

500 mg (0.0021 Mol) 3.10-Dimethyl-5-deaza-isoalloxazin 1 werden nach der oben angegebenen Vorschrift in wässriger Lösung (pH-Wert=4) mit 15,2 g (0,1 Mol) Phenoxyessigsäure photochemisch umgesetzt. Nach einer Bestrahlungsdauer von ca. 65 Stunden ist die Reduktion beendet. Die ausgefallene Verbindung wird abgesaugt, gewaschen und getrocknet. (Das Reduktionsprodukt ist etwas oxidationsempfindlich)

Ausbeute: 640 mg = 88% d.Th.

Schmp.: 225-227°C

Analyse für $C_{20}H_{19}N_3O_3$ (MG: 349,32)

ber.: C: 68,75 % H: 5,48 % N: 12,03 %

gef.: C: 67,13 % H: 5,48 % N: 11,34 %

Spektroskopische Daten

IR (KBr): 1705 (C=O), 1630 (C=O), 1210 (C-O), 760 cm^{-1} (arom.C-H)

UV ($H_2O/pH=5$): $\lambda_{max}(\log \epsilon) = 314 (4.127)$, 277 nm (3.963).

(pH = 11): $\lambda_{max}(\log \epsilon) = 308 (4.049)$, 259 nm (4.269).

(CH_3CN): $\lambda_{max}(\log \epsilon) = 306 (4.079)$, 222 nm (4.410).

1H -NMR ($CDCl_3$): $\delta = 3.30$ (s, N(3)- CH_3), 3.50 (s, N(10)- CH_3),
4.00 (m, C(5 α)- H_2), 4.50 (m, C(5)-H),
6.60-7.50 (m, Arom.), 10.90 (s, N(1)-H).

MS (70eV): m/e = 349 (1%, M^+), 317 (5%), 256 (9%), 242 (100%),
(250°C) 228 (13%), 185 (29%), 155 (7%), 130 (6%),
128 (8%).

- 5-(1'-Cycloheptatrienyl)-1.5-dihydro-3.10-dimethyl-5-deaza-isoalloxazin (16d)

500 mg (0,0021 Mol) 3.10-Dimethyl-5-deaza-isoalloxazin 1 werden nach der o.a. Vorschrift in Acetonitril (ca. 400 ml) mit 9,2 g (0,1 Mol) Cycloheptatrien photochemisch umgesetzt. Die

Reaktion ist nach einer Bestrahlungsdauer von 30 min beendet, was außer an der absinkenden Absorption bei 400 nm auch an der Auflösung des Endproduktes in Acetonitril zu erkennen ist. Nach dem Eindampfen bis auf 20 ml wird die Lösung mit 150 ml Äther versetzt und zur Kristallisation in den Kühlschrank gestellt. Nach dem Stehen über Nacht wird das Produkt abgesaugt, gewaschen und im Ölpumpenvakuum über P_2O_5 bei 60°C getrocknet. Zur Reinigung wird die Substanz aus Natriumcarbonatlösung mit verdünnter HCl umgefällt.

Ausbeute: 580 mg $\pm$ 84,1 % d.Th.

Schmp.: 160-163°C

Analyse für $C_{20}H_{19}N_3O_2$ (MG: 333,28)

ber.: C: 72,07 % H: 5,71 % N: 12,61 %

gef.: C: 71,67 % H: 5,84 % N: 11,89 %

Spektroskopische Daten

IR (KBr): 1685 (C=O), 1610 (C=O), 750 (arom.C-H),
700 cm^{-1} (olef.C-H).

UV (Methanol): $\lambda_{max}(\log \epsilon) = 306$ (4.041), 231 nm (4.212).

(pH = 11) : $\lambda_{max}(\log \epsilon) = 305$ (3.991), 256 nm (4.324).

(CH_3CN) : $\lambda_{max}(\log \epsilon) = 303$ (4.100), 227 nm (4.286).

1H -NMR ($DMSO_{d6}$): $\delta = 1.44$ (m, C(5)-H), 3.18 (s, N(3)- CH_3),
3.34 (s, N(10)- CH_3), 4.40 (d, $J=8Hz$, C(5)-H),
5.44, 6.07, 6.54 (3m, Tropyliumrest),
7.00-7.55 (m, Arom.), 11.04 (s, N(1)-H).

MS (70eV) : m/e = 333 (1%, M^+), 242 (71%), 241 (100%), 212(25%),
(200°C) 185 (46%), 184 (46%), 156 (29%),
155 (75%), 91 (5%).

- 5.5'-Bis-(1.5-dihydro-3.10-dimethyl-5-deaza-isoalloxazin)(18)

500 mg (0,0021 Mol) 3.10-Dimethyl-5-deaza-isoalloxazin 1 werden nach der o.a. Vorschrift in wässriger Lösung (pH-Wert=4) mit 4,5 g (0,05 Mol) Oxalsäure photochemisch umgesetzt. Nach einer Bestrahlungsdauer von 2 h ist die Reduktion beendet. Die ausgefallene Verbindung wird abgesaugt, gewaschen und getrocknet. Die anfangs weiße Verbindung färbt sich beim Stehen an der Luft nach kurzer Zeit gelb, was auf eine gewisse Oxidation zurückzuführen ist. Zur Reinigung wird deshalb die Verbindung in wässriger Natriumcarbonatlösung gelöst, das Oxidationsprodukt (unlöslich) abgetrennt und das Dimere durch Versetzen mit verd. HCl wieder ausgefällt. Eine so behandelte Probe ist für ca. 2 Wochen gegen Oxidation stabil, so daß sämtliche Spektren vom Dimeren aufgenommen werden können. Ausbeute: 450 mg = 90 % d.Th.

Schmp.: 305-308°C

Analyse für $C_{26}H_{24}N_6O_4$ (MG: 484,50)

ber.: C: 64,45 %	H: 4,99 %	N: 17,35 %
gef.: C: 63,39 %	H: 4,98 %	N: 17,05 %

Spektroskopische Daten

IR (KBr): 1690 (C=O), 1630 (C=O), 750 (arom.C-H).

UV (Methanol): $\lambda_{\max}(\log \epsilon) = 310 (4.199), 231 \text{ nm} (4.488).$

(pH = 11): $\lambda_{\max}(\log \epsilon) = 312 (4.176), 258 (4.316),$
247 nm (4.301).

(CH₃CN) : $\lambda_{\max}(\log \epsilon) = 312 (4.176), 220 \text{ nm} (4.470).$

<u>¹H-NMR</u>	(δ-Werte)	DMSO _{d6}		D ₂ O/Na ₂ CO ₃		CF ₃ COOD(anaerob)	
		I	II	I	II	I	II
N(3)-CH ₃ ,s		2.90/2.70		2.80/2.47		3.35/3.30	
N(10)-CH ₃ ,s		3.20/3.30		3.25/3.35		3.52/3.70	
C(5)-H ,s		4.20/4.10		4.10/4.03		4.47/4.40	
Arom. ,m		6.70-7.50		6.28-7.28		6.65-7.40	
N(1)-H ,s		10.70		-		-	

MS (70eV): m/e = 241 (100%), 212 (27%), 185 (23%), 184 (50%),
(150°C) 181 (32%), 156 (32%), 129 (25%), 128 (25%).

Der Molpeak bei einer Masseneinheit von 484
ist nicht zu erkennen.

Neben Oxalsäure können weitere Carbonsäuren in wässriger Lösung photochemisch zum dimeren Dihydrodeazaflavin umgesetzt werden. Dabei werden bis auf eine pH-Wert Variation Reaktionsbedingungen eingehalten, nur ist die Bestrahlungsdauer für die einzelnen Substrate unterschiedlich.

Substrate	pH-Wert	Bestrahlungsdauer	Ausbeute	Schmelzpunkt
Malonsäure	8	36 h	55%	306-08°C
Brenztraubensäure	8	32 h	60%	308°C
Pivalinsäure	8	24 h	70%	305-06°C
Glycin	8	5 h	40%	305-07°C
NN-Dimethylglycin	4	60'	70%	307-08°C
	8	30'	80%	306-07°C
EDTA	4	1 h20'	90%	306°C
Mandelsäure	4	2 h30'	85%	305-06°C
	8	30'	87%	305°C
O-Methyl-mandelsäure	4	2 h45'	70%	307°C
dFl _{red} -H-5-COOH(12 bzw. 16a)	4	1 h	95%	306-07°C

Bei pH-Wert = 13 reagieren auch Alkohole unter Bildung der o.g. Verbindung

Substrate	pH-Wert	Bestrahlungsdauer	Ausbeute	Schmelzpunkt
Methanol	13	3 h	90%	306-07°C
Äthanol	13	3 h20'	85%	305-07°C
Isopropanol	13	2 h30'	88%	308°C

Reaktionen in Acetonitril

500 mg (0,0021 Mol) 3.10-Dimethyl-5-deaza-isocalloxazin 1 werden nach o.a. Vorschrift in Acetonitril mit 4 g (0,05 Mol) Cyclohexadien photochemisch umgesetzt. Nach einer Bestrahlungsdauer von ca. 2 h ist die Reduktion beendet. Die ausgefallene Verbindung wird abgesaugt, mit Acetonitril und Äther gewaschen und über P_2O_5 im Ölpumpenvakuum bei $60^{\circ}C$ getrocknet.

Ausbeute: 450 mg = 90% d.Th.

Schmp.: $306-308^{\circ}C$

Im Schmelzpunkt und in sämtlichen spektroskopischen Daten stimmt dieses Produkt mit dem oben ausführlich beschriebenen Photoprodukt, dem dimeren Dihydrodeazaflavin, überein.

Dieses Dimere stellt in allen Fällen eine Mischung aus zwei Diastereomeren (Dimer I, Dimer II) dar, deren Verhältnis nach pH-Wert und Bestrahlungsdauer immer unterschiedlich ist.

Isolierung der diastereomeren Komponenten

- Dimer I: 200 mg des Isomerengemischs werden unter anaeroben Bedingungen in ca. 50 ml einer 6N HCl suspendiert. Nach dem Stehenlassen über Nacht wird der farblose Rückstand abfiltriert, mit Methanol und Äther gewaschen und im Vakuum bei $50^{\circ}C$ über P_2O_5 getrocknet.

Ausbeute: 160 mg = 80 % d.Th., die mit Spuren dFl_{ox} verunreinigt sind.

- Dimer II: 200 mg des Isomerengemischs werden in 100 ml einer wässrigen Lösung vom pH-Wert = 8 gelöst. Diese Lösung wird dann unter anaeroben Bedingungen drei Stunden lang in der beschriebenen Photoapparatur bestrahlt. Danach wird die Lösung mit Essigsäure auf den pH-Wert von 4 gebracht. Das dabei ausfallende Dimere wird abfiltriert, mit Methanol und Äther gewaschen und im Vakuum bei $50^{\circ}C$ über P_2O_5 getrocknet.

Ausbeute: 180 mg = 90 % d.Th.

Die analytischen Daten, wie Schmelzpunkt, C-H-N-Analyse, IR-, UV- und Massenspektren sind für die beiden Diastereomeren identisch und ebenfalls identisch mit der Mischung der beiden Dimeren. Die unterschiedlichen NMR-Daten siehe oben.

- 5.5'-Bis-(1.5-dihydro-3.7.8.10-tetramethyl-5-deaza-
isoalloxazin) (19)

Diese Verbindung wird mit Hilfe der gleichen photochemischen Reduktionsmethode dargestellt, die oben beschrieben ist (Substrat: Cyclohexadien in Acetonitril) ausgehend von 3.7.8.10-Tetramethyl-5-deaza-isoalloxazin 5 (250 mg = 0,00093 Mol).

Ausbeute: 240 mg = 95 % d.Th.

Schmp.: 350-352°C

Analyse für $C_{30}H_{32}N_6O_4$ (MG: 540.6)

ber.: C: 66.65 % H: 5.97 % N: 15.55 %

gef.: C: 65.80 % H: 5.96 % N: 15.42 %

Spektroskopische Daten

IR (KBr) : 1690 (C=O), 1630 (C=O), 760 cm^{-1} (arom. C-H).

UV ($H_2O/pH=7$): $\lambda_{max}(\log \epsilon) = 318 (4.255), 228 \text{ nm} (4.544).$

($H_2O/pH=11$): $\lambda_{max}(\log \epsilon) = 314 (4.204), 256 (4.568),$
245 nm (4.562).

1H -NMR ($D_2O/pH=10$) Dimer I: $\delta = 1.90, 2.00 (2s, C(7,8)-CH_3),$
2.60 (s, N(3)- CH_3), 3.15 (s, N(10)- CH_3),
3.95 (s, C(5)-H), 6.10, 6.25 (2s, C(6,9)-H).

Dimer II: $\delta = 1.90, 2.00 (2s, C(7,8)-CH_3),$
2.40 (s, N(3)- CH_3), 3.30 (s, N(10)- CH_3),
3.90 (s, C(5)-H), 6.10, 6.25 (2s, C(6,9)-H).

MS (70eV): m/e = 269 (87%), 240 (100%), 212 (87%), 183 (93%),
(180°C) 182 (68%).

Der Molpeak bei einer Masseneinheit von 540
ist nicht zu erkennen.

5.5. Darstellung von Deazaflavin-Addukten durch Reaktion mit nukleophilen Reagenzien

- 5-Cyano-1.5-dihydro-3.10-dimethyl-5-deaza-isoalloxazin (35)

500 mg (0.0021 Mol) 3.10-Dimethyl-5-deaza-isoalloxazin 1 werden in 150 ml destilliertem Wasser suspendiert und mit 500 mg KCN im Dunkeln versetzt. Nach ca. 20 min Rühren hat sich das suspendierte Deazaflavin unter Reduktion gelöst, was durch spektrophotometrische Überprüfung (Verschwinden des Maximums bei 392 nm) nachgewiesen wird. Die Lösung wird auf ca. pH=5 gebracht, wobei das Addukt ausfällt. Das leicht orangegelb gefärbte Produkt (durch Verunreinigungen oxidierten Materials) wird abgesaugt, mit einer Mischung aus Methanol und Äther (1 : 2) gewaschen und im Ölpumpenvakuum über P_2O_5 bei 50°C getrocknet.

Ausbeute: 370 mg = 66.5 % d.Th.

Schmp.: 318-320°C

Analyse für $C_{14}H_{12}N_4O_2$ (MG: 268.27)

ber.: C: 62.88 % H: 4.51 % N: 20.89 %

gef.: C: 61.93 % H: 4.47 % N: 20.53 %

Spektroskopische Daten

IR (KBr): 1695 (C=O), 1620 (C=O), 750 cm^{-1} (arom.C-H).

UV (H_2O /pH=7) : $\lambda_{max}(\log \epsilon) = 306$ (4.140), 230 nm (4.310).

(pH = 11) : $\lambda_{max}(\log \epsilon) = 304$ (4.204), 268 nm (4.398).

(CH_3CN) : $\lambda_{max}(\log \epsilon) = 304$ (4.181), 232 nm (4.354).

1H -NMR ($DMSO_{d6}$): $\delta =$ 3.17 (s, N(3)- CH_3), 3.41 (s, N(10)- CH_3),
5.30 (s, C(5)-H), 7.00-7.57 (m, Arom),
10.90 (s, N(1)-H).

MS (70eV): m/e = 268 (3%, M^+), 266 (3%), 242 (17%), 241 (100%),
(180°C) 212 (17%), 184 (34%), 155 (38%).

- 1.5-Dihydro-3.10-dimethyl-5-oxo-5-deaza-isoalloxazin (36)

Diese Verbindung ist schon in der Dissertation von BAUCH⁵⁴⁾ beschrieben. Sie wurde im Rahmen dieser Arbeit auf folgendem unabhängigen Weg dargestellt.

500 mg (0,0021 Mol) 3.10-Dimethyl-5-deaza-isoalloxazin 1 werden in ca. 150 ml 1N NaOH suspendiert und mit 500 mg KCN im Dunkeln versetzt. Nach ca. 1 h Rühren im Dunkeln hat sich das suspendierte Deazaflavin gelöst. Die Lösung wird auf pH=5 gebracht, wobei ein Produkt ausfällt, welches abgesaugt, mit Methanol und Äther gewaschen und über P₂O₅ im Vakuum bei 50°C getrocknet wird.

Ausbeute: 410 mg = 77 % d.Th.

Schmp.: 294-297°C

Analyse für C₁₃H₁₁N₃O₃ (MG: 257.30)

ber.: C: 60.69 % H: 4.31 % N: 16.33 %

gef.: C: 60.10 % H: 4.29 % N: 16.12 %

Spektroskopische Daten

IR (KBr): 1730 (C=O), 1670 (C=O), 1610 (C=O), 770cm⁻¹
(arom.C-H).

UV (pH = 9): $\lambda_{\max}(\log \epsilon)$ = 340 (sh), 307 (3.914), 266 (4.230),
246 nm (4.190).

(CH₃CN) : $\lambda_{\max}(\log \epsilon)$ = 380 (sh), 364 (3.763), 312 (4.017),
300 (3.863), 265 nm (4.444).

¹H-NMR (CF₃COOH): δ = 3.65 (s, N(3)-CH₃), 4.35 (s, N(10)-CH₃)
7.88-8.78 (m, Arom.).

MS (70 eV) : m/e = 257 (100%, M⁺), 256 (21%), 227 (38%),
(200°C) 200 (50%), 181 (21%).

- 1.5-Dihydro-3.10-dimethyl-5-nitromethyl-5-deaza-isoalloxazin(39)

500 mg (0,0021 Mol) 3.10-Dimethyl-5-deaza-isoalloxazin 1 werden in ca. 200 ml NaOH (pH=12) suspendiert und im Überschuß mit Nitromethan versetzt. Nach ca. 20 min Rühren löst sich das suspendierte Deazaflavin unter leichter Orangefärbung. Die basische Lösung wird auf ca. pH = 7 gebracht, dabei fällt das Produkt aus. Es wird abgesaugt, gewaschen und im Ölpumpenvakuum über P_2O_5 getrocknet.

Ausbeute: 450 mg = 77 % d.Th.

Schmp.: 288-291°C

Analyse für $C_{14}H_{14}N_4O_4$ (MG: 302,28)

ber.: C: 55,62 % H: 4,67 % N: 18,54 %

gef.: C: 54,92 % H: 4,72 % N: 18,01 %

Spektroskopische Daten

IR (KBr) : 1695 (C=O), 1625 (C=O), 1490 (C-NO₂),
1375 (C-NO₂), 760 cm⁻¹ (arom. C-H).

UV (CH₃CN): $\lambda_{\max}$ (log ϵ) = 301 (4.107), 225 nm (4.238).

¹H-NMR (DMSO_{d6}): δ = 3.12 (s, N(3)-CH₃), 3.32 (s, N(10)-CH₃),
4.32-4.80 (m, C(5)-H/C(5)-H₂)⁺,
6.95-7.35 (m, Arom.), 10,90 (s, N(1)-H).

⁺) Die Signale dieser Protonen liegen übereinander, sie sind nicht getrennt zu erfassen.

MS (70 eV): m/e = 225 (2%), 241 (100%), 212 (17%), 184 (36%),
(200°C) 155 (40%), 61 (32%).
(Kein Molpeak bei 302 ME.)

- 1.5-Dihydro-3.10-dimethyl-5(-propanyl-2'-on)-5-deaza-isoalloxazin (40)

500 mg (0,0021 Mol) 3.10-Dimethyl-5-deaza-isoalloxazin 1 werden in 50 ml Aceton suspendiert und mit 50 ml Pufferlösung pH-Wert=13 (KCl/NaOH) versetzt. Dabei löst sich noch ungelöstes Deaza-isoalloxazin auf. Nach zweistündigem Stehenlassen wird die Lösung auf den pH-Wert = 5 gebracht und am Rotationsverdampfer eingengt, wobei nach kurzer Zeit eine weiße Substanz

auskristallisiert. Durch Stehenlassen über Nacht im Kühlschrank wird die Kristallisation vervollständigt. Die Substanz wird abgesaugt, mit Äther gewaschen und getrocknet.

Ausbeute: 330 mg = 53 % d.Th.

Schmp.: 291-294°C

Analyse für $C_{16}H_{17}N_3O_3$ (MG: 299,22)

ber.: C: 64,21 % H: 5,69 % N: 14,05 %

gef.: C: 63,49 % H: 5,65 % N: 13,65 %

Spektroskopische Daten

IR (KBr): 1705 (C=O), 1635 (C=O), 760 cm^{-1} (arom. C-H).

UV (Methanol): λ_{max} (log ϵ) = 311 (4.100), 228 nm (4.199).

(pH = 11): λ_{max} (log ϵ) = 306 (4.025), 258 nm (4.215).

(CH_3CN): λ_{max} (log ϵ) = 307 (4.121), 226 nm (4.312).

<u>$^1\text{H-NMR}$</u> (δ -Werte)	CDCl_3	DMSO_{d6}
C(5 γ)- CH_3 , s	2.05	1.90
C(5 α)- H_2 , d	2.65 J=6Hz	2.40 ⁺
N(3)- CH_3 , s	3.33	3.05
N(10)- CH_3 , s	3.50	3.30
C(5)-H, t	4.55 J=6Hz	4.30 J=7Hz
Arom., m	6.85-7.45	6.90-7.30
N(1)-H, s	10.50	10.80

⁺ Das Duplett ist in DMSO_{d6} durch das DMSO -Signal überdeckt, so daß die Kopplungskonstante nicht erkennbar ist.

MS (70 eV): m/e = 299 (4%, M^+), 297 (11%), 242 (66%),
(80°C) 241 (100%), 212 (49%), 185 (46%),
184 (93%), 158 (37%), 156 (46%),
155 (95%), 129 (34%), 128 (29%).

- 5-Cyano-3,10-dimethyl-5-deaza-isoalloxazin (37)

200 mg (0,00075 Mol) der Substanz 35 werden in 250 ml Chloroform suspendiert und 2 h mit der Quecksilber-Tauchlampe bestrahlt. Dabei färbt sich die Lösung intensiv gelb und zeigt eine grüne Fluoreszenz. Durch spektrophotometrische Überprüfung wird die Vollständigkeit der Reaktion gezeigt. Die Lösung wird dann eingeengt und das Produkt mit Äther ausgefällt. Nach Absaugen wird die Substanz mit Äther gewaschen und über P_2O_5 im Ölpumpenvakuum getrocknet. Umkristallisation ist nicht notwendig, da das Endprodukt dünnchromatographisch rein anfällt. Ausbeute: 180 mg = 90 % d.Th.

Schmp.: 234-237°C (Zers.)

Analyse für $C_{14}H_{10}N_4O_2$ (MG: 266,17)

ber.: C: 63,12 % H: 3.76 % N: 21,04 %

gef.: C: 62,83 % H: 3.80 % N: 20.74 %

Spektroskopische Daten

IR (KBr): 1700 (C=O), 1650 (C=O), 760 cm^{-1} (arom.C-H).

UV ($H_2O/pH=7$): $\lambda_{max}(\log \epsilon) = 446 (4.104), 348 (4.104),$
266 (4.774), 250 (sh),
222 nm (4.732).

(6N HCl): $\lambda_{max}(\log \epsilon) = 369 (4.314), 259 (4.637),$
239 nm (4.567).

(CH_3CN): $\lambda_{max}(\log \epsilon) = 477 (sh), 543 (4.093), 427 (sh),$
337 (4.061), 270 (4.699),
246 (sh), 224 nm (4.714).

1H -NMR (CF_3COOD): $\delta = 3.75 (s, N(3)-CH_3), 4.70 (s, N(10)-CH_3),$
8.20-9.00 (m, Arom).

MS (70 eV): m/e = 266 (100%, M^+), 251 (7%), 237 (22%), 223 (14%),
(200°C) 222 (11%), 210 (27%), 209 (78%), 181 (32%),
180 (70%), 154 (42%).

- 3.10-Dimethyl-5(-propanyl-2'-on)-5-deaza-isoalloxazin (41)

200 mg (0,00067 Mol) der Verbindung 40 werden in 200 ml Acetonitril suspendiert und 2 h mit einer Quecksilber-Tauchlampe bestrahlt. Dabei färbt sich die Lösung gelb und zeigt eine blaugrüne Fluoreszenz. Durch spektrophotometrische Überprüfung wird die Vollständigkeit der Reaktion gezeigt. Die Lösung wird eingeeengt und das Produkt mit Äther ausgefällt. Nach Absaugen wird die Substanz mit Äther gewaschen und über P_2O_5 im Ölpumpenvakuum getrocknet. Umkristallisation ist nicht notwendig, da das Endprodukt dünnschichtchromatographisch rein anfällt.

Ausbeute: 180 mg = 90 % d.Th.

Schmp.: 233-235°C

Analyse für $C_{16}H_{15}N_3O_3$ (MG: 297.21)

ber.: C: 64.63 % H: 5.09 % N: 14.14 %

gef.: C: 63.90 % H: 5.01 % N: 14.26 %

Spektroskopische Daten

IR (KBr): 1710 (C=O), 1640 (C=O), 760 cm^{-1} (arom.C-H).

UV ($H_2O/pH=7$): $\lambda_{max}(\log \epsilon) = 390 (4.041), 320 (4.049),$
253 nm (4.740).

(6N HCl) : $\lambda_{max}(\log \epsilon) = 333 (4.328), 249 \text{ nm } (4.774).$

(CH_3CN) : $\lambda_{max}(\log \epsilon) = 427 (sh), 390 (4.041),$
317 (4.069), 265 (sh),
245 nm (4.760).

1H -NMR (CF_3COOH): $\delta = 2.90 (s, C(5\gamma)-CH_3), 3.70 (s, N(3)-CH_3),$
4.65 (s, N(10)- CH_3), 5.45 (s, C(5 α)- CH_2),
7.90-8.80 (m, Arom.).

MS (70 eV): m/e = 297 (5%, M^+), 272 (70%), 240 (100%), 196 (80%).
(150°C)

5.6. Synthese von 5-deuterierten Deazaflavinen

- 5-Deuterio-3.10-dimethyl-5-deaza-isoalloxazin (25)

3-Methyl-6-(N-methyl-anilino)-uracil 24 (1,5 g = 0,065 Mol) wird in 3 ml Deuterioameisensäure suspendiert und mit 16,5 ml Acetanhydrid versetzt. Die Mischung wird 3 h am Rückfluß erhitzt, dann werden 30 ml Äthanol hinzugefügt. Beim Stehenlassen über Nacht fällt ein gelbes Produkt aus, welches abfiltriert, mit Äther gewaschen und über P_2O_5 bei $50^\circ C$ im Vakuum getrocknet wird.

Ausbeute: 1.3 g = 83 % d.Th.

Schmp.: $318-320^\circ C$

(MG: 242, massenspektroskopisch)

Spektroskopische Daten

IR (KBr): identisch mit Verbindung 1

UV (Methanol): identisch mit Verbindung 1

1H -NMR (CF_3COOD): δ = 3.70 (s, N(3)- CH_3), 4.50 (s, N(10)- CH_3), 7.90-8.60 (m, Arom.). Das Proton am C(5) der nicht deuterierten Verbindung 1 bei δ = 9.90 ppm fehlt im Spektrum.

MS (70 eV): m/e = 242 (100%, M^+), 213 (78%), 185 (50%), (180 $^\circ C$) 156 (44%).

- 5.5-Dideuterio-1.5-dihydro-3.10-dimethyl-5-deaza-isoalloxazin(26)

Diese Verbindung wird nach der angegebenen Reduktionsmethode mit $Na_2S_2O_4$ in D_2O dargestellt. 0.24 g (0.001 Mol) der Verbindung 25 werden in 50 ml D_2O suspendiert und 0.6 g $Na_2S_2O_4$ hinzugefügt. Die Reaktionsmischung wird 30 min lang bei $50^\circ C$ gerührt und danach der pH-Wert der Lösung mit Essigsäure auf ca. 4 eingestellt. Dabei fällt ein schwach gelber Niederschlag aus, der abfiltriert, mit Äthanol und Äther gewaschen und über P_2O_5 im Vakuum bei $50^\circ C$ getrocknet wird.

Ausbeute: 0.22 g = 90 % d.Th.

Schmp.: $283-285^\circ C$

(MG: 245, massenspektroskopisch)

Spektroskopische Daten

IR (KBr): identisch mit Verbindung 9.

UV (Methanol): identisch mit Verbindung 9.

¹H-NMR (DMSO_{d6}): δ = 3.14 (s, N(3)-CH₃), 3.33 (s, N(10)-CH₃),
6.93-7.28 (m, Arom), 10.10 (s, N(1)-H).
Die Protonen am C(5) der nicht deuterierten
Verbindung 9 bei δ = 3.65 ppm fehlen
im Spektrum.

MS (70 eV): m/e = 245 (100%), 244 (90%), 243 (90%),
(200°C) 242 (90%), 230 (40%), 186 (52%),
185 (28%).

- 5.5'-Bis-(5-deuterio-1.5-dihydro-3.10-dimethyl-5-deaza- isoalloxazin) (27)

240 mg (0.001 Mol) der Verbindung 25 werden nach der angegebenen Methode mit Cyclohexadien (2 g = 0.025 Mol) unter anaeroben Bedingungen in 150 ml Acetonitril photoreduziert. Nach einer Bestrahlungszeit von 1 h ist die Reduktion beendet. Das in CH₃CN unlösliche Dimer wird abfiltriert, mit CH₃CN und Äther gewaschen und im Vakuum über P₂O₅ bei 50°C getrocknet.

Ausbeute: 0.22 g = 92 % d.Th.

Schmp.: 305-307°C

Spektroskopische Daten

IR (KBr): identisch mit Verbindung 18.

UV (Methanol): identisch mit Verbindung 18.

¹H-NMR (DMSO_{d6}): Dimer I δ = 2.90 (s, N(3)-CH₃), 3.20 (s, N(10)-CH₃), 6.70-7.50 (m, Arom), 10.70 (N(1)-H).
Dimer II δ = 2.70 (s, N(3)-CH₃), 3.30 (s, N(10)-CH₃), 6.70-7.50 (m, Arom), 10.70 (N(1)-H).
Die Protonen am C(5) u. C(5') der nicht deuterierten Verbindung 18 bei δ = 4.20 ppm für Dimer I und bei δ = 4.10 ppm für Dimer II fehlen im Spektrum.

MS (70 eV): m/e = 242 (100%), 241 (56%), 213 (25%), 186 (22%),
(250°C) 185 (44%), 184 (25%), 156 (63%), 155 (31%).

Der Molpeak bei 486 Masseneinheiten ist nicht zu erkennen.

6. LITERATURVERZEICHNIS

1. D.E. O'BRIEN, L.T. WEINSTOCK & C.C. CHENG, J.Heterocycl. Chem. 7, 99 (1970).
2. J. FISHER, R. SPENCER & CH. WALSH, Biochemistry 15, 1054 (1976).
3. M.S. JORNS & L.B. HERSH, J.Biol.Chem. 250, 3620 (1975).
4. L.B. HERSH & M.S. JORNS, J.Biol.Chem. 250, 8728 (1975).
5. L.B. HERSH, M.S. JORNS, J. PETERSON & M. CURRIE, J.Am.Chem.Soc. 98, 865 (1976).
6. B.A. AVERILL, A. SCHÖNBRUNN, R.H. ABELES, L.T. WEINSTOCK, C.C. CHENG, J. FISHER, R. SPENCER & CH. WALSH, J.Biol.Chem. 250, 1603 (1975).
7. M.S. JORNS & L.B. HERSH, J.Biol.Chem. 251, 4872 (1976).
8. P. HEMMERICH, V. MASSEY & H. FENNER, FEBS-Lett. 84, 5 (1977).
9. D.E. EDMONDSON, B. BARMAN & G. TOLLIN, Biochemistry 11, 1133 (1972).
10. H.-J. DUCHSTEIN, H. FENNER, P. HEMMERICH & W.R. KNAPPE, Eur.J.Biochem. eingereicht zur Publikation.
11. M. BRÜSTLEIN & T.C. BRUCE, J.Am.Chem.Soc. 94, 6548 (1972).
12. M. SUN & P.S. SONG, Biochemistry 12, 4663 (1973).
13. P.S. SONG, J.D. CHOI, R.D. FUGATE & K. YAGI, in "Flavins and Flavoproteins" 1976, T.P. SINGER, ed. Elsevier Amsterdam, S. 381.
14. P. MICHAELIS, Dissertation, FU Berlin 1973.
15. H. FENNER & P. MICHAELIS, Arch.Pharm. 305, 751 (1972).
16. H.H. RÜSSLER, Dissertation, FU Berlin 1974.
17. R. SPENCER, J. FISHER & CH. WALSH, Biochemistry 15, 1043 (1976).
18. R. GRAUERT, Dissertation, FU Berlin 1977.
19. H. FENNER, R. GRAUERT & P. HEMMERICH, Liebigs Ann.Chem., im Druck.
20. H. FENNER & R. GRAUERT, Arch.Pharm., im Druck.
21. M. JANDA & P. HEMMERICH, Angew.Chem. 88, 475 (1976); Angew.Chem.Int.Ed.Engl. 15, 443 (1976).
22. H. FENNER, R. GRAUERT, P. HEMMERICH, H. MICHEL & V. MASSEY, Eur.J.Biochem., eingereicht zur Publikation.
23. P. HEMMERICH, C. VEEGER & H.S.S. WOOD, Angew.Chem. 77, 699 (1965).

24. G.R. PENZER & G.K. RADDA, *Quart.Rev.* 21, 43 (1967).
25. J.B. LAMBOOY, *Heterocyclic compounds* Vol. 9 Ed.
R.C. ELDERFIELD, Verl.: John Wiley & Sons Inc.,
N.Y. 1967.
26. P. HEMMERICH, G. NAGELSCHNEIDER & C. VEEGER, *FEBS-Lett.* 8,
69 (1970).
27. A.H. NEIMS & L. HELLERMAN, *Ann.Rev.Biochem.* 1970, 740.
28. V.M. BEREZOVSKII, L.S. TUL'CHINSKAYA & N.A. POLYAKOVA,
Russ.Chem.Rev. 41, 574 (1972).
29. R.S. RIVLIN, ed. "Riboflavin" N.Y.: Plenum Press 1975.
30. P. HEMMERICH, *Fortschr.Chem.org.Naturst.*, ed: W. HERZ,
H. GRIESEBACH, C.W. KIRBY, Springer Verlag Wien,
N.Y. 1976, 451.
31. T.C. BRUCE, *Progress in Bioorganic Chemistry*,
ed.: E.T. KAISER, F.J. KEZDY Verlag Wiley N.Y.
1976.
32. W.R. KNAPPE & P. HEMMERICH, *Liebigs Ann.Chem.* 1976,
2037.
33. W.R. KNAPPE, Dissertation, Univ. Konstanz 1971 und dort
zit. Lit.
34. M. BRÜSTLEIN, Dissertation, Univ. Konstanz 1971.
35. W. HAAS, Dissertation, Univ. Konstanz 1973.
36. B. GÄRTNER, Dissertation, Univ. Konstanz 1974.
37. E.A. ZELLER, *Ann.N.Y.Acad.Sci.* 107, 811 (1963).
38. L.R. SWETT, W.B. MARTIN, J.D. TAYLOR, G.M. EVERETT,
A.A. WYKES & Y.C. GLADISH, *Ann.N.Y.Acad.Sci.*
107, 891 (1963).
39. E.A. ZELLER, B. GÄRTNER & P. HEMMERICH, *Z.Naturforsch.*
27B, 1050 (1972).
40. B. GÄRTNER & P. HEMMERICH, *Angew.Chem.* 87, 137 (1975);
Angew.Chem.Int.Ed.Engl. 14, 110 (1975).
41. B. GÄRTNER, P. HEMMERICH & E.A. ZELLER, *Eur.J.Biochem.*
87, 137 (1976).
42. H.Y.K. CHUANG, D.R. PATEK & L. HELLERMAN, *J.Biol.Chem.*
249, 2381 (1974).
43. L. ORELAND, H. KINEMUCHI & B.Y. YOO, *Life Sci.* 13, 1533
(1973).
44. A.L. MAYCOCK, *J.Am.Chem.Soc.* 97, 2270 (1975).
45. H. FENNER, H.H. RÜSSLER, H.-J. DUCHSTEIN & P. HEMMERICH,
in "Flavins and Flavoproteins" 1976,
T.P. SINGER, ed. Elsevier Amsterdam, S. 343.
46. K. WALLENFELS & H. SCHÜLY, *Liebigs Ann.Chem.* 621, 86
(1959).

47. K. WALLENFELS & H. DIEKMANN, Liebigs Ann.Chem. 621, 166 (1959).
48. K. WALLENFELS & H. SCHÜLY, Liebigs Ann.Chem. 621, 178 (1959).
49. K. WALLENFELS, D. HOFMANN & H.SCHÜLY, Liebigs Ann.Chem. 621, 188 (1959).
50. F. KRÖHNKE & K. ELLEGAST, Liebigs Ann.Chem. 600, 198 (1956).
51. F.E. KING, T.J. KING & G.B. THOMPSON, J.Chem.Soc. 1948, 552.
52. F. YONEDA, Y. SAKUMA, S. MIZUMOTO & R. ITO, J.C.S.Perkin I 1976, 1805.
53. M. CONRAD & H. REINBACH, Chem.Ber. 34, 1339 (1901).
54. W. BAUCH, Dissertation, FU Berlin 1977.
55. G. BLANKENHORN, Eur.J.Biochem. 67, 67 (1976).
56. I. PECHT & M. GOLDBERG, Persönliche Mitteilung.
57. P.S. SONG, Ann.N.Y.Acad.Sci. 158, 410 (1969) u. die dort zit. Lit.
58. K.H. DUDLEY, A. EHRENBERG, P. HEMMERICH & F.MÜLLER, Helv.Chim.Acta 47, 1354 (1967).
59. G. BLANKENHORN, in: 2nd Symp. Pyridine Nucleotide-Dependent Dehydrogenases, Walter de Gruyter Verlag, Berlin, im Druck 1977.
60. M. STANKOWICH & V. MASSEY, Biochem.Biophys.Acta 452, 335 (1976).
61. R.D. DRAPER & L.L. INGRAHAM, Arch.Biochem.Biophys. 125, 802 (1968).
62. P.J. ELVING, persönliche Mitteilung, zit. in 59).
63. S.P. VAISH & G. TOLLIN, Bioenergetics 1, 181 (1970).
64. H. RUDY, Fortschr.Chem.org.Naturst. 2, 61 (1939).
65. W.L. CAIRNS & D.E. METZLER, J.Am.Chem.Soc. 93, 1772(1971).
66. M. GLADYS & W.R. KNAPPE, Chem.Ber. 107, 3658 (1974).
67. G. SCHÖLLNHAMMER & P. HEMMERICH, Eur.J.Biochem. 44, 561 (1974).
68. M. BRÜSTLEIN, W.R. KNAPPE & P. HEMMERICH, Angew.Chem. 83, 854 (1971); Angew.Chem.Int.Ed.Engl. 10, 804 (1971).
69. P. HEMMERICH, V. MASSEY & G. WEBER, Nature(London) 213, 728 (1967).
70. W.H.WALKER, P. HEMMERICH & V. MASSEY, Helv.Chim.Acta 50, 2269 (1967); Eur.J.Biochem. 13, 258 (1970).

71. M. BRÜSTLEIN & P. HEMMERICH, FEBS-Lett. 1, 335 (1968).
72. W. HAAS & P. HEMMERICH, in Vorbereitung.
73. G.R. PENZER & G.K. RADDA, Biochem.J. 109, 259 (1968).
74. B. GÄRTNER & P. HEMMERICH, in Vorbereitung.
75. T. GODA, Deiri Setai 1, 1 (1947); zit C.A. 45, 8058b(1951).
76. P. BYROM & J.H. TURNBULL, Photochem.Photobiol. 6, 125 (1967).
77. P. BYROM & J.H. TURNBULL, Photochem.Photobiol. 8, 243(1968).
78. K. ENNS & W.H. BURGESS, J.Am.Chem.Soc. 87, 5766 (1968).
79. G.R. PENZER, Biochem.J. 116, 733 (1970).
80. A.W. GALSTON, Proc.Nat.Acad.Sci.USA 35, 10 (1949); Science (Washington) 111, 619 (1951).
81. L.BRAUNER & M. BRAUNER, Z.Bot. 42, 83 (1954).
82. B. NATHANSON, M. BRODY, S. BRODY & S.B. BROYDE, Photochem. Photobiol. 6, 177 (1967).
83. J. MEYER, Z.Bot. 46, 124 (1958).
84. P.S. SONG, in "Flavins and Flavoproteins", H.KAMIN, ed. University Park Press, Baltimore, 1971, S. 37
85. F.R. STERMITZ, C.C. WEI & C.M. O'DONELL, J.Am.Chem.Soc. 92, 2745 (1971).
86. V. ZANKER & H. CNOBLOCH, Z.Naturforsch. 17 b, 819 (1962).
87. F. MADER & V. ZANKER, Chem.Ber. 97, 2418 (1964).
88. H. GÖTH, P. CERUTTI & H. SCHMID, Helv.Chim.Acta 48, 1395 (1965).
89. R. NOYORI, M. KATO, M. KAWANISI & H. NOZAKI, Tetrahedron 25, 1125 (1969).
90. D.G. WHITTEN & Y.J. LEE, J.Am.Chem.Soc. 93, 961 (1971).
91. J. LIBMAN, J.C.S. Chem.Comm. 1976, 198.
92. H.J. DUCHSTEIN & P. HEMMERICH, in: 2nd Symp. Pyridine Nucleotide-Dependent Dehydrogenases, Berlin, im Druck 1977.
93. F. YONEDA, Y. SAKUMA & P. HEMMERICH, J.C.S. Chem.Comm. eingereicht zur Publikation.
94. H.-J. DUCHSTEIN, P. HEMMERICH, F. YONEDA & Y. SAKUMA, in Vorbereitung.
95. W.R. KNAPPE, Z.Naturforsch. 32b, 434 (1977).
96. F. ROTHFELDER, Staatsexamensarbeit, Univ.Konstanz 1977.
97. W.R. KNAPPE, persönl. Mitteilung.
98. V. MASSEY & P. HEMMERICH, Eur.J.Biochem. eingereicht zur Publikation.

99. M. JANDA, persönl. Mitteilung.
100. W. BAUCH, H.-J. DUCHSTEIN & H. FENNER, in Vorb.
101. W. BAUCH & H. FENNER, Arch.Pharm. im Druck.
102. C. HENTZSCH, Dissertation FU Berlin.
103. F. MÜLLER, V. MASSEY, C. HEIZMANN, P. HEMMERICH, J.-M. LHOSTE & D.C. GOULD, Eur.J.Biochem. 9, 392(1969).
104. D. LAMBETH & G. PALMER, J.Biol.Chem. 248, 6095 (1973).
105. M.B. YARMOLINSKY & S.P. COLOWICK, Biochem.Biophys.Acta 20, 177 (1956).
106. W.S. CAUGHEY & K.A. SCHELLENBERG, J.Org.Chem. 31, 1978 (1966).
107. F. MÜLLER, P. HEMMERICH, A. EHRENBERG, D. PALMER & V. MASSEY, Eur.J.Biochem. 14, 185 (1970).
108. F. MÜLLER, M. BRÜSTLEIN, P. HEMMERICH, V. MASSEY & W.H. WALKER, Eur.J.Biochem. 25, 573 (1972).
109. A. EHRENBERG, F. MÜLLER & P. HEMMERICH, Eur.J.Biochem. 2, 286 (1967).
110. G.K. RADDA & M. CALVIN, Biochemistry 3, 384 (1964).
111. E.J. LAND & A.J. SWALLOW, Biochem.Biophys.Acta 162, 327 (1968).
112. H. BEINERT, J.Am.Chem.Soc. 78, 5323 (1956).
113. V. MASSEY, persönl. Mitteilung.
114. Q.H. GIBSON & J.W. HASTINGS, Biochem.J. 83, 368 (1962).
115. J.H. SWINEHART, J.Am.Chem.Soc. 88, 1056 (1966).
116. G. BLANKENHORN, Biochemistry 14, 3172 (1975).
117. J. LUDOWIEG & A. LEVY, Biochemistry 3, 373 (1964).
118. F. KRÖHNKE & K. ELLEGAST, Liebigs Ann.Chem. 600, 176 (1956).
119. F. KRÖHNKE & I. VOGT, Liebigs Ann.Chem. 600, 211 (1956).
120. J.W. PATTON, Ph.D. THESIS, Univ. of Wisconsin, 1961; zit. in: E.M. KOSOWER, Molekular Biochemistry, McGraw Hill 1962, 166.
121. I. YOKOE & T.C. BRUCE, J.Am.Chem.Soc. 97, 450 (1975).
122. R.F. HUTTON & F.H. WESTHEIMER, Tetrahedron 3, 73 (1958).
123. CH. WALSH, A. SCHÖNBRUNN & R.H. ABELES, J.Biol.Chem. 246, 6855 (1971).
124. D.J.T. PORTER, J.G. VOET & H.J. BRIGHT, J.Biol.Chem. 248, 4400 (1973).
125. P. HEMMERICH & J. LAUTERWEIN, in G.L. EICHHORN (ed.) Inorganic Biochemistry, Amsterdam 2, 1168 (1970).
126. P. HEMMERICH & A. WESSIAK in: "Flavins and Flavoproteins" 1976, T.P.SINGER, ed.Elsevier Amsterdam, S. 9.

Am Ende der Arbeit möchte ich mich für die Unterstützung während meiner Promotion bedanken:

Bei Karyn Bluhme, Heidrun Haug und Eberhard Krienitz von der Universität Konstanz für technische Assistenz, bei Wolf-Dieter Duchstein für das Zeichnen der Formeln und Durchsehen des Manuskriptes, bei Winfried Bähr für die Anfertigung der Photographien und bei Hertha Kluger und Reinhold Bess für Reinschrift des Manuskriptes.

Lebenslauf

17. 4. 1949	geboren in Berlin-Mariendorf
1955 - 1961	Grundschule in Berlin-Mariendorf
1961 - 1968	Eckener-Oberschule in Berlin-Mariendorf
März 1968	Abitur
1968 - 1973	Chemie-Studium an der Freien Universität Berlin
Oktober 1973	Diplom in Chemie
Juli 1974	Beginn der vorliegenden Dissertation
25. 4. 1975	Einstellung als wissenschaftlicher Assistent am Pharmazeutischen Institut der FU Berlin.

